

**Analyse der physiologischen Funktion von Mitgliedern
der Rieske-Typ Eisen-Schwefel-Proteinfamilie
in der inneren Plastidenhülle**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
an der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von
Sandra Bartsch
aus Wunsiedel

Bayreuth, im Juli 2009

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2004 bis Juli 2009 am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Universität Bayreuth angefertigt.

Die Arbeit wurde eingereicht am 29. Juli 2009.

Das Rigorosum fand statt am 15. Februar 2010.

Der Prüfungsausschuss bestand aus:

<i>em. Prof. Dr. Dr. h.c. E. Beck</i>	(Vorsitzender)
<i>PD Dr. C. Reinbothe</i>	(Erstgutachter)
<i>Prof. Dr. B. Westermann</i>	(Zweitgutachter)
<i>Prof. Dr. K. Dettner</i>	
<i>Prof. Dr. F. X. Schmid</i>	

Diese Arbeit widme ich
meinen Eltern
und
meiner Schwester

Inhaltsverzeichnis

1	Ausführliche Zusammenfassung	1
2	A role for chlorophyllide <i>a</i> oxygenase in the regulated import and stabilization of light-harvesting chlorophyll <i>a/b</i> proteins	49
3	A protochlorophyllide (Pchl) <i>a</i> oxygenase involved in plastid import of NADPH:Pchl oxidoreductase (POR) A is essential for plant viability	51
4	Three thioredoxin targets in the inner envelope membrane of chloroplasts function in protein import and chlorophyll metabolism	109
5	Summary	111
6	Zusammenfassung	115
7	Eigenanteil der Arbeiten in den Artikeln/Manuskripten	119
8	Anhang	123

1 Ausführliche Zusammenfassung

Die wohl auffälligsten Bestandteile pflanzlicher Zellen sind die Chloroplasten, die als Orte der Photosynthese die Energieversorgung grüner Pflanzen in Form von ATP und reduzierten NADs sicherstellen und somit für deren photoautotrophes Wachstum unentbehrlich sind. Entwicklungsgeschichtlich lassen sich diese semiautonomen Zellorganellen auf ein endosymbiontisches Ereignis zurückführen, in welchem eine (proto)eukaryotische Zelle einen primitiven, photosynthetischen Prokaryoten, einen Vorfahren der heutigen Cyanobakterien, „verschlungen“ hat (Margulis, 1970; Reumann et al., 1999; McFadden, 2001). Beide Organismen entwickelten daraufhin eine symbiontische Beziehung, in welcher der photosynthetisch-aktive Prokaryot den Wirt, also die eukaryotische Zelle, mit Energie versorgte und im Gegenzug essentielle Nährstoffe erhielt bzw. sich in einer geschützten Umgebung befand. Im Verlauf der weiteren Evolution transferierte der prokaryotische Endosymbiont einen Großteil seiner Gene auf das nukleäre Genom der eukaryotischen Wirtszelle (Timmis et al., 2004), was untrennbar mit einem Verlust seiner Autonomie verbunden war. Während experimentell eine relativ hohe Gentransferrate nachgewiesen werden konnte (Huang et al., 2003), ist der eigentliche Mechanismus der Übertragung der plastidären DNA auf den Nukleus weitgehend unbekannt. Heute sind mehr als 90 % der Chloroplasten-Proteine nukleär codiert (Leister, 2003), so dass Prozesse wie Plastiden-Teilung, -Differenzierung und -Ausreifung weitestgehend unter der Kontrolle des pflanzlichen Zellkerns stattfinden. Die übrigen intraplastidär benötigten Proteine werden im Gegensatz dazu von plastidärer DNA (Sugiura, 1992), die in Form eines zirkulären Chromosoms (= Plastom) vorliegt (Kung 1977), codiert und gebildete Transkripte im Anschluss von plastideneigenen Ribosomen translatiert (Mullet, 1988; Reinbothe und Parthier, 1990; Reinbothe et al., 1993). Hierzu zählen u.a. auch photosynthetische Gene, deren Expression sowohl durch transkriptionelle (Pfannschmidt et al., 1999; Pfannschmidt und Liere, 2005), post-transkriptionelle (Deng und Gruissem, 1987; Rochaix, 2001) als auch durch translationale (Danon, 1997; Choquet und Wollmann, 2002) Mechanismen reguliert wird. Daneben existiert eine retrograde Signalkette zwischen Plastid und Nukleus, so dass die Expression nukleärer Gene auf die aktuellen Bedürfnisse der Plastiden hin angepasst werden kann (Leister, 2005).

Über den sog. C5-Stoffwechselweg können Chloroplasten auf diese Weise neben Tetrapyrollkomponenten, die in verschiedenen Proteinen als prosthetische Gruppe am Elektronentransport teilnehmen und als Redox-Sensor agieren (Mock et al., 1998), auch

Chlorophyll (Bogoard, 1967; von Wettstein et al., 1971; 1995) synthetisieren. Als erstes Zwischenprodukt dieses Biosynthesewegs ist die C5-Verbindung 5-Aminolävulinsäure (5-ALA; von Wettstein et al., 1995) zu nennen, die aus Glutamat durch Umsetzung mit den Enzymen Glutamyl-tRNA-Synthetase, Glutamyl-tRNA-Reduktase und Glutamat-1-Semialdehyd-Aminomutase hervorgeht (siehe Abb. 1).

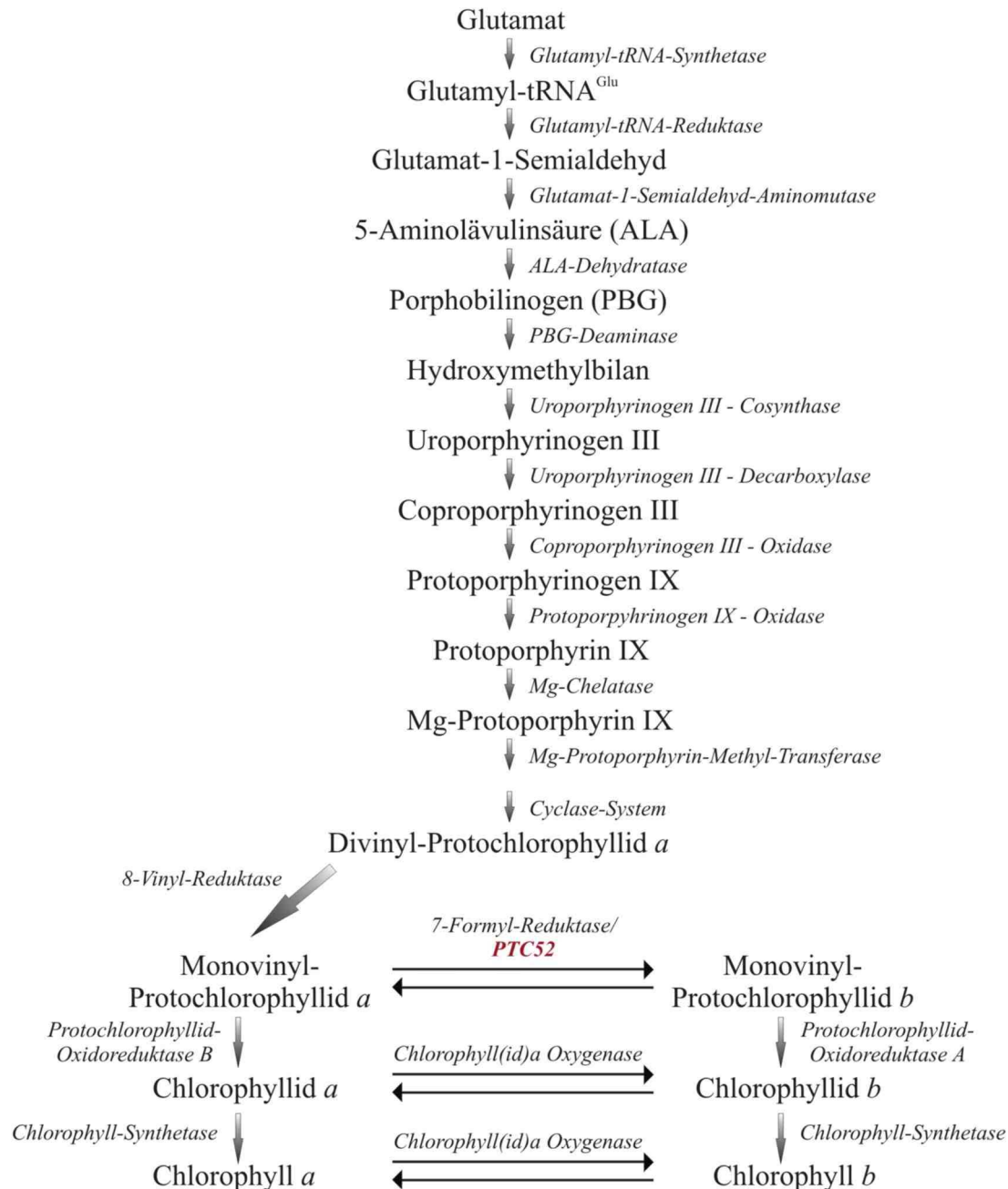


Abb. 1: Biosyntheseweg von Chlorophyll in Pflanzen

Enzyme der einzelnen Reaktionen sind kursiv dargestellt. Die Aktivität von PTC52 als Protochlorophyllid a Oxygenase wurde experimentell bewiesen (siehe Manuskript 2).

Nach von Wettstein et al. 1995.

Der Tetrapyrrolmetabolismus ist strikt reguliert, so dass unter normalen Wachstumsbedingungen keine freien Intermediate oder Endprodukte vorliegen. Ungebundenes, d.h. nicht an Proteine gebundenes Chlorophyll und freie, akkumulierende Chlorophyll-Vorstufen können leicht photooxidiert werden und sind als Photosensitizer beim Einsatz von Diphenyl-Ether-Herbiziden bekannt (Rebeiz et al., 1984). Ihre schädigende Wirkung lässt sich darauf zurückführen, dass sie überschüssige Lichtenergie absorbieren und auf Sauerstoff übertragen (Matringe et al., 1989; Mock et al., 1998), was zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (= ROS), u.a. Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), führt (Arakane et al., 1996). ROS können verschiedene zelluläre Reaktionen, wie z.B. vorzeitige Alterung, Nekrose und programmierten Zelltod (= Apoptose) auslösen (Mock et al., 1998; op den Camp et al., 2003), jedoch gleichzeitig auch protektive Mechanismen induzieren, an denen sowohl enzymatische als auch nicht-enzymatische Komponenten beteiligt sind (Foyer et al., 1994; Asada, 1996).

Keimen Angiospermen im Dunkeln (= etioliert), so wird die Bildung des Pigments auf der Stufe von Protochlorophyllid (= Pchlid) angehalten, d.h. ist eine bestimmte Menge dieser Vorstufe vorhanden, verhindert ein regulatorischer Feedback-Mechanismus, der durch das FLU-Protein ausgeübt wird, die weitere Synthese von 5-ALA. Sobald angereichertes Pchlid im Verlauf der Belichtung zu Chlorophyllid (Chlid) und weiter zu Chlorophyll umgesetzt wird, wird diese Blockade wieder aufgehoben (Reinbothe und Reinbothe, 1996).

Das Enzym NADPH:Protochlorophyllid Oxidoreduktase (POR)

In etiolierten Keimlingen von Angiospermen, in denen Pchlid in spektroskopisch nachweisbaren Mengen akkumuliert, liegt dieses Zwischenprodukt der Chlorophyll-Biosynthese mit dem Enzym NADPH:Protochlorophyllid Oxidoreduktase (POR) assoziiert vor und bildet gemeinsam mit dem Co-Substrat NADPH einen ternären Komplex (Griffiths, 1978; Apel et al., 1980). Das nukleär codierte, im Cytosol als größeres Präkursor-Protein synthetisierte POR-Enzym wird dabei posttranslational in den Plastiden importiert, wo es als sog. Schlüsselenzym des lichtinduzierten Ergrünens (Nielsen, 1974; Griffiths, 1975; 1978; Apel et al., 1980) den einzigen direkt vom Licht abhängigen Schritt der Chlorophyll-Biosynthese höherer Pflanzen, die Reduktion von Pchlid zu Chlorophyllid (Chlid), katalysiert (Griffiths, 1975; 1991; Forreiter et al., 1990). Während dieser Aktivität, die in etiolierten Pflanzen am größten ist (Maplestone und Griffiths, 1980; Santel und Apel, 1981), wird POR sehr schnell inaktiviert und im Folgenden abgebaut (Kay und Griffiths, 1983; Häuser et al., 1984; Forreiter et al., 1990).

Im Prolamellarkörper von Etioplasten verschiedener Angiospermen, z.B. Gerste und *Arabidopsis thaliana*, konnten mit PORA und PORB zwei eng verwandte POR-Proteine nachgewiesen werden (Armstrong et al., 1995; Holtorf et al., 1995), die beide zwar sowohl von Licht als auch von NADPH abhängig sind, sich jedoch hinsichtlich ihres Expressionsmusters im Verlauf der pflanzlichen Entwicklung stark voneinander unterscheiden (Benli et al., 1991; Reinbothe et al., 1995a; 1995b; 1995c). Während PORA nur transient in etiolierten Keimlingen akkumuliert, wird PORB konstitutiv sowohl in etiolierten, belichteten als auch in Licht-adaptierten Pflanzen exprimiert (Holtorf et al., 1995). Dieses beobachtete partielle Überlappen der Expression beider POR-Enzyme suggeriert, dass sowohl PORA als auch PORB für eine effiziente De-Etiolierung der Keimlinge unerlässlich ist (Reinbothe et al., 2003a). Aber auch hinsichtlich des bevorzugten Substrats fallen deutliche Unterschiede zwischen beiden Isoenzymen auf. Während PORA eine höhere Bindungsaffinität zu Pchlid *b* zeigt, bevorzugt PORB Pchlid *a* als Substrat (Reinbothe et al., 1999).

Sobald Keimlinge die Erdoberfläche durchbrechen, sind sie sofort der direkten Sonneneinstrahlung ausgesetzt, jedoch noch nicht dazu in der Lage, Photosynthese zu betreiben, so dass eine schnell einsetzende Photoprotektion und Chlorophyllbiosynthese für das Überleben der Pflanze essentiell sind. Reaktive Sauerstoffradikale, deren Bildung – wie bereits erwähnt – durch freie Pchlid-Moleküle induziert werden könnte (op den Camp et al., 2003), sind dabei der entscheidende Faktor, da diese Membranlipide durch Peroxidation massiv schädigen würden (Tripathy und Chakraborty, 1991; Chakraborty und Tripathy, 1992) und somit enormen Einfluss auf die Membranintegrität, die plastidäre Ultrastruktur und die pflanzliche Entwicklung besäßen. Der Zelltod ist als Folge solcher Schäden meist unausweichlich (op den Camp et al., 2003).

Um zum einen die Absorption geringer Lichtmengen und die Chlorophyllbiosynthese zu ermöglichen und zum anderen eine photoprotektive Wirkung auszuüben, bilden beide POR-Isoenzyme im Prolamellarkörper von Etioplasten gemeinsam mit ihren Pigment-Substraten, Pchlid *a* bzw. Pchlid *b* (Shedbalkar et al., 1991), und NADPH eine höher-molekulare Struktur, den sog. „*light-harvesting*“-**POR-Pchlid**- (LHPP) Komplex, dessen Existenz *in vitro* und *in vivo* bestätigt werden konnte (Reinbothe et al., 1999; 2003b). Innerhalb dieser Struktur interagieren (zumindest im Gewebe) jeweils fünf PORA:Pchlid *b*:NADPH – Ternärkomplexe mit einem PORB:Pchlid *a*:NADPH – Komplex und bilden dabei einen Suprakomplex, der zusätzlich mit Galakto- und Sulfolipiden des Prolamellarkörpers assoziiert ist (Reinbothe et al., 1999; 2003b). In den oberen Erdschichten bzw. nach Durchbrechen des Keimlings durch

die Erdoberfläche absorbieren PORA-gebundene, photoinaktive Pchlid *b* – Moleküle auftreffende Lichtquanten und übertragen diese Energie auf den zentral gelegenen PORB:Pchlid *a*:NADPH – Ternärkomplex. PORB wird als Enzym aktiv und reduziert Pchlid *a* zu Chlid *a*. Daraufhin zerfällt der LHPP-Komplex (Reinbothe et al., 2003b), was vermutlich die Licht-induzierte Desintegration des Prolamellarkörpers auslöst (Kahn, 1968; Kahn et al., 1970). Erst jetzt wird PORA als Pchlid *b* – reduzierendes Enzym aktiv. Wie von Reinbothe und Mitarbeitern (2004a) für Gerste gezeigt werden konnte, binden auf diese Weise gebildete Chlid-Moleküle an wasserlösliche Chlorophyll-Bindungsproteine, die sie zu den Thylakoiden transportieren, wo dann der weitere Aufbau der photosynthetischen Membran stattfindet (Sundqvist und Dahlin, 1997).

Die Plastidenhülle

Neben einem regulierten Austausch von Metaboliten zwischen Stroma und Cytosol kommt der Plastidenhülle auch als Ort der Biosynthese von Fettsäuren und verschiedenen Lipiden, beispielsweise von Galaktolipiden, den vorherrschenden Bestandteilen der Hüllmembranen (Douce und Joyard, 1990), eine essentielle Bedeutung zu. Doch auch Teile des C5-Wegs der Tetrapyrrolbiosynthese (siehe S. 1 f.), z.B. die Bildung von Pchlid (von Wettstein et al., 1995), sind in der Plastidenhülle lokalisiert (Joyard et al., 1990; Pineau et al., 1993; Joyard et al., 1998).

Um eine zielgerichtete Translokation der vom Genom der Wirtszelle codierten, intraplastidär benötigten Proteine zurück in die semiautonomen, photosynthetisch-aktiven Organellen zu gewährleisten, müssen diese zunächst im Cytosol in Form größerer Vorstufenproteine (Keegstra et al., 1989; Archer und Keegstra, 1990) mit einem abspaltbaren, N-terminalen, ca. 20-120 Aminosäuren umfassenden Transit-Peptid (Bruce, 2001; Vojta et al., 2004) synthetisiert werden (Reumann et al., 1999). Dies trifft auch auf die beiden an der Chlorophyll-Biosynthese beteiligten Isoenzyme PORA und PORB zu, die als größere Präkursor-Proteine entsprechend der plastidären Entwicklung importiert werden (Beale und Weinstein, 1990; Reinbothe et al., 1995a; 1995b) und – wie zuvor geschildert – für die Pflanze eine essentielle Bedeutung beim Wechsel von der Skotomorphogenese zur Photomorphogenese besitzen. Neueren Proteomics-Analysen zu Folge ergibt sich ein komplexeres Bild bezüglich des Proteinimportes als ursprünglich angenommen. So gelangte beispielsweise die Arbeitsgruppe um Kleffmann (2004) zu dem Ergebnis, dass von den insgesamt 604 identifizierten Chloroplasten-Proteinen in *Arabidopsis thaliana* nur 376

($\approx 62\%$) über eine solche „klassische“ Transit-Sequenz verfügten. 37 Proteine zeigten stattdessen ein mitochondriales Targeting-Signal, 40 ein Transit-Peptid zur Translokation ins Endoplasmatische Retikulum und 142 wiesen keinerlei abspaltbares Signalpeptid auf.

Der eigentliche Translokationsprozess durch die für Proteine impermeable, doppelte Chloroplasten-Hüllmembran gestaltet sich demzufolge als äußerst vielschichtig, wobei mit hoher Wahrscheinlichkeit verschiedenste komplex aufgebaute Protein-Import-Maschinen (Bédard und Jarvis, 2005; Martin und Müller, 1998; Martin et al., 1998) existieren, die sich nicht nur hinsichtlich ihrer Zusammensetzung, sondern auch ihrer Spezifität und Aktivität voneinander unterscheiden (Miras et al., 2002; 2007; Nada und Soll, 2004; Villajero et al., 2005).

Der Standard-Protein-Import-Apparat: Tic/Toc-Komplex

Als Standard-Protein-Import-Apparat der Plastiden gilt der sog. Tic/Toc-Komplex, der sich aus hetero-oligomeren Multiproteinkomplexen der beiden Hüllmembranen zusammensetzt. Gemäß Schnell et al. (1997) werden dabei die Bestandteile der Import-Maschinerie der äußeren Hülle als **Toc**-Komponenten (*translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts*), diejenigen der inneren Hüllmembran als **Tic**-Komponenten (*translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts*) bezeichnet und deren jeweilige molekulare Masse als Suffix angefügt. Für den eigentlichen Transportvorgang müssen beide Plastidenhüllen miteinander kooperieren (Fuks und Schnell, 1997; Lübeck et al., 1997), was deren topologische Annäherung voraussetzt (Jarvis und Soll, 2001).

Die Proteintranslokation selbst ist ein energieabhängiger Prozess, der sich laut Reumann et al. (1999) in vier Phasen unterteilen lässt:

- a.) Energieunabhängige Interaktion des Präkursor-Proteins mit Membranlipiden.
- b.) Reversible Bindung des Vorstufenproteins an Rezeptorproteine der Plastidenoberfläche, d.h. des Toc-Apparates (Archer und Keegstra, 1990; Cline und Henry, 1996), in Anwesenheit geringer ATP-Konzentrationen, wodurch das eigentliche Transportgeschehen initiiert wird (Perry und Keegstra, 1994).
- c.) Bildung früher Translokationsintermediate (*early intermediate stage*) bestehend aus den Multiproteinkomplexen der äußeren und inneren Plastidenhülle in Anwesenheit von GTP und geringen Mengen an ATP ($\leq 100\ \mu\text{M}$) (Olsen und Keegstra, 1992; Young et al., 1999). In dieser Phase hat das Transit-Peptid die äußere Hüllmembran

bereits durchquert und Kontakt zu Komponenten des Tic-Komplexes aufgenommen (Wu et al., 1994; Ma et al., 1996).

- d.) Komplette Translokation des Präkursor-Proteins durch beide Hüllmembranen, wobei höhere ATP-Konzentrationen ($>100 \mu\text{M}$) im Stroma unentbehrlich sind (Theg et al., 1989). Im Stroma selbst findet schließlich die Prozessierung, d.h. das Abspalten des Transit-Peptids, und möglicherweise ein intraplastidäres Targeting statt.

Komponenten des Toc-Komplexes und deren Funktionsweise

Entsprechend früherer Untersuchungen, die mit Chloroplasten aus Erbse durchgeführt wurden, setzt sich der Toc-Komplex, der neben der Erkennung und der Bindung auch die Translokation des zu importierenden Präkursor-Proteins durch die äußere Plastidenhülle vermittelt (Bédard und Jarvis, 2005; Hofmann und Theg, 2005; Kessler und Schnell, 2006), aus den drei Core-Komponenten Toc159, Toc75 und Toc34 zusammen (Perry und Keegstra, 1994; Hirsch et al., 1994; Kessler et al., 1994; Schnell et al., 1994; Tranel et al., 1995; Ma et al., 1996; Kouranov und Schnell, 1997; Bölder et al., 1998; Chen et al., 2000; Jelic et al., 2002). Wie neuere Forschungsergebnisse mit Chloroplasten aus *Arabidopsis thaliana* zeigten, werden nicht alle Präkursor-Proteine, die ein N-terminales Transit-Peptid besitzen, über denselben Toc-Komplex importiert. So fanden sich hier mit Toc120 bzw. Toc130 zwei zu Toc159-verwandte Proteine, die ebenfalls sowohl über eine konservierte GTP-Bindungsdomäne als auch über einen Membran-Anker verfügen, sich jedoch von Toc159 hinsichtlich der Länge ihrer N-terminalen, zum Cytosol gerichteten Domäne unterscheiden (Bauer et al., 2000; Ivanova et al., 2004). Ihre Beteiligung an der Bindung der Vorstufenproteine bedingt das beobachtete differentielle Importverhalten der entsprechenden Toc-Proteine. Während die Translokation von photosynthetisch relevanten Präkursor-Proteinen, wie z.B. pPORB, über Toc159 verläuft, scheinen Toc120 bzw. Toc130 den Import anderer, nicht-photosynthetisch aktiver Vorstufenproteine zu vermitteln (Smith et al., 2004).

Darüber hinaus zeigte sich, dass für das regulatorische GTP-Bindungsprotein in *Arabidopsis thaliana* die Zwillingsproteine Toc33 und Toc34 existieren, die sich sowohl durch ihre Präkursor-Spezifität als auch ihre Expression während der pflanzlichen Entwicklung voneinander unterscheiden (Jarvis et al., 1998; Gutensohn et al., 2000; Jelic et al., 2003; Kubis et al., 2004).

Schließlich wird auch die dritte Komponente des Toc-Core-Komplexes, Toc75, in *Arabidopsis thaliana* von drei verschiedenen Genen codiert, von denen wiederum zwei

unterschiedliche Expressionsmuster aufweisen (Baldwin et al., 2005). Toc75, das eine hohe Sequenzähnlichkeit zu löslichen Kanälen in der äußeren Membran von Cyano- bzw. Gram-negativen Bakterien zeigt (Bölter et al., 1998; Reumann et al., 1999), bildet dabei den zentralen hydrophilen Translokationskanal der äußeren Plastidenhülle (Schnell et al., 1994), bestehend aus einer Porin-ähnlichen β -Barrel-Struktur mit insgesamt 16 Transmembran- β -Faltblättern (Hinnah et al., 1997; Sveshnikova, 2000), durch den der Großteil der cytosolischen Präkursor-Proteine ins Plastidenstroma importiert wird (May und Soll, 1999; Hinnah et al., 2002).

Komponenten des Tic-Komplexes und deren Funktionsweise

Während des sog. „*early intermediate stage*“ hat das Präkursor-Protein die äußere Plastidenhülle durchquert und trifft auf die Komponenten des Tic-Komplexes (Kouranov und Schnell, 1997), über deren Bedeutung bzw. Funktion bis zum jetzigen Zeitpunkt weniger als über die Komponenten des Toc-Komplexes bekannt ist und die immer wieder Gegenstand kontroverser Diskussionen sind (Kessler und Blobel, 1996; Caliebe et al., 1997; Hidalgo et al., 1997; Gray et al., 1997; Pfannschmidt et al., 1999; Oswald et al., 2001; Bédard und Jarvis, 2005).

Als zentrale Core-Komponente dieses Multiproteinkomplexes gilt das integrale Membranprotein Tic110 (Kessler und Blobel, 1996), welches mit seiner β -Barrel-Konformation ein charakteristisches strukturelles Merkmal von Proteinen aufweist, die an der Bildung von Poren (Bainbridge et al., 1998) beteiligt sind. Dieses Protein könnte daher mindestens einen Teil des Protein-Import-Kanals der inneren Chloroplastenhülle bilden (Heins et al., 2002), wobei seine große C-terminale Domäne zum Stroma hin gerichtet ist, wo sie wahrscheinlich Faktoren rekrutiert, die aktiv am Importprozess teilnehmen (Kessler und Blobel, 1996; Nielsen et al., 1997; Jackson et al., 1998; Inaba et al., 2003). Als Beispiel hierfür ist das molekulare Chaperon Hsp93, ein plastidäres Homolog des bakteriellen ClpC (caseinolytisches Protein der C-Klasse) zu nennen, das ebenfalls zu den Core-Komponenten des Tic-Komplexes gezählt wird (Akita et al., 1997; Nielsen et al., 1997; Constan et al., 2004).

Beim dritten, noch fehlenden Bestandteil des Core-Komplexes handelt es sich mit Tic40 um ein ca. 40 kDa schweres, integrales Membranprotein (Wu et al., 1994), dessen weitestgehend hydrophiler C-terminaler Bereich ebenfalls ins Stroma ragt (Chou et al., 2003). Da Tic110 und Tic40 eine ähnliche Topologie aufweisen und unter oxidativen Bedingungen durch eine Disulfidbrücke verbunden sind (Stahl et al., 1999), liegt die Vermutung nahe, dass beide

Proteine miteinander interagieren, um so den Import der Präkursor-Proteine zu ermöglichen (Chou et al., 2006; Bédard et al., 2007; Chiu und Li, 2008).

Darüber hinaus finden sich mit Tic22 bzw. Tic20 zwei weitere Proteine, die mit hoher Wahrscheinlichkeit mit der Transit-Sequenz des Vorstufenproteins in Wechselwirkung treten (Kouranov und Schnell, 1997; Kouranov et al., 1998; 1999; Chen et al., 2002). Es wird vermutet, dass zusätzliche identifizierte Proteinkomponenten mit einem Molekulargewicht von ca. 62 kDa (Tic62), 55 kDa (Tic55) und 32 kDa (Tic32) dazu in der Lage sind, auf unterschiedliche Redox-Zustände innerhalb des Chloroplasten zu reagieren und so den Protein-Import entsprechend den herrschenden Verhältnisse anzupassen (Caliebe et al., 1997; Kühler et al., 2002). Wie phylogenetische Analysen zeigten, gehört Tic55 zu einer Familie von non-Häm Oxygenasen, die in Pflanzen und Bakterien über hoch-konservierte Rieske- und mononukleare Eisen-Bindungsdomänen verfügen (Caliebe et al., 1997; Gray et al., 2004; Gross und Bhattacharya, 2008). Über die exakte Funktion dieses Proteins innerhalb des Tic-Komplexes existieren bis zum heutigen Zeitpunkt allerdings nur Vermutungen.

Unterschiedliche Importwege von pPORA & pPORB

Die Voraussetzung zur Bildung der bereits beschriebenen LHPP-Komplexe (siehe S. 4 f), die beim Wechsel von der Skotomorphogenese zur Photomorphogenese eine essentielle Bedeutung für die Pflanze besitzen, ist ein effektiver posttranslationaler Import der nukleär codierten, im Cytosol synthetisierten Präkursor-Proteine pPORA und pPORB. Ursprüngliche Annahmen gingen davon aus, dass dieser für beide Proteine – wie für andere Vorstufenproteine – energieabhängig (Pfisterer et al., 1982; Cline et al., 1985; Olsen et al., 1989; Olsen und Keegstra, 1992; Flügge und Hinz, 1986; Theg et al., 1989; Schnell und Blobel, 1993) über den Tic/Toc-Komplex erfolgt (Perry et al., 1991; Schnell et al., 1991; Oblong und Lamppa, 1992; Theg und Geske, 1992; Cline et al., 1993; Jarvis und Soll, 2001). Erst die genauere Analyse des Importwegs von pPORA und pPORB in Gerste (Reinbothe et al., 1995a; 1995c) zeigte Unterschiede im Importmechanismus auf.

Im Vergleich zu Plastiden etiolierter Keimlinge, in denen maximale Gesamtmengen an POR (Σ PORA und PORB) nachweisbar sind, zeigen im Licht gekeimte Pflanzen nur Spuren der prozessierten Enzyme (Apel, 1981; Batschauer und Apel, 1984; Griffiths et al., 1985; Möisinger et al., 1985; Forreiter et al., 1990; Benli et al., 1991). Während PORA in Etioplasten akkumuliert und bei Belichtung mengenmäßig stark abnimmt, ist die Menge an PORB sowohl in Etioplasten als auch in Chloroplasten in etwa konstant.

Wie *In-Vitro*-Protein-Import-Studien mit aus Gerste isolierten Plastiden zeigten, ist die Translokation von pPORA von intraplastidär vorhandenem Pchlid, das in etiolierten Keimlingen ebenfalls in spektroskopisch nachweisbaren Konzentrationen akkumuliert, abhängig und wird durch die herrschenden Lichtbedingungen reguliert (Reinbothe et al., 1995a-c; 1996; 1997; 2000). Reicht in Etioplasten die endogene Pchlid-Menge aus, um den Translokationsprozess zu initiieren, nimmt diese im Verlauf der lichtinduzierten Chloroplastendifferenzierung dramatisch ab, was mit dem Verlust des Importvermögens einhergeht. Werden die intraplastidären Pchlid-Konzentrationen jedoch durch Inkubation der Organellen mit dem Pchlid-Präkursor 5-ALA erhöht, so kommt es zur Pchlid-Bildung und der Translokationsprozess kann erneut in Gang gesetzt werden (Reinbothe et al., 1995a), was die Abhängigkeit des pPORA-Imports von endogenem Pchlid verdeutlicht. Dieser konnte darüber hinaus von Kim und Apel (2004) auch *in vivo* in *Arabidopsis thaliana* nachgewiesen werden, indem sie verschiedene Fusionsproteine, bestehend aus Präkursor-Protein und GFP, in den Pflanzen exprimierten und deren plastidäre Lokalisation analysierten. Während in Protoplasten aus Licht-adaptierten, grünen Pflanzen kein PORA-GFP detektierbar war, konnte die Integration von PORB-GFP in die Thylakoidmembranen bzw. die Akkumulation von SSU-GFP im Chloroplastenstroma nachgewiesen werden. Bei analog durchgeführten Untersuchungen mit etiolierten Keimlingen waren demgegenüber alle drei Fusionsproteine, d.h. also auch PORA-GFP, innerhalb der Plastiden detektierbar, wofür man die hier vorhandenen, hohen intraplastidären Pchlid-Konzentrationen verantwortlich machte. Der Einfluss von Pchlid auf die intrazelluläre Verteilung von PORA-GFP konnte des Weiteren mit Hilfe transgener *flu*-Mutanten nachgewiesen werden, die einen Defekt der metabolischen Feedback-Kontrolle der 5-ALA-Synthese aufweisen (siehe S. 3), was im Dunkeln zu einer unkontrollierten Akkumulation von freiem, d.h. nicht Protein-gebundenem, Pchlid führt. Werden etiolierte Pflanzen belichtet, so bleichen diese schnell aus und sterben ab. Durch eine Kultivierung unter kontinuierlichen Lichtverhältnissen kann dies verhindert werden, da hier gebildetes Pchlid unmittelbar zu Chlid reduziert wird. Während sowohl *flu*- als auch Wildtyp-Keimlinge, die unter Dauerlicht angezogen worden waren, nur PORB-GFP und SSU-GFP, jedoch kein PORA-GFP, innerhalb der Chloroplasten ansammelten, führte der Transfer der Pflanzen in die Dunkelheit zur Pchlid-Akkumulation und damit auch zum Import von pPORA-GFP. Auch die Expression chimärer Fusionsproteine in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen bestätigte die Pchlid-Abhängigkeit der pPORA-Translokation. Wurde das Transit-Peptid von pPORA (= transA), in dem sich die vermeintliche Pchlid-Bindungsstelle befindet, z.B. an den sog. 'reifen' Teil von PORB-GFP gekoppelt, so wurde der Transport dieses

Fusionsproteins in Licht-adaptierte Pflanzen von Pchlid abhängig, während das reziproke Konstrukt, transB-PORA-GFP, auch in Chloroplasten grüner Kotyledonen akkumulierte. Vergleichbare Ergebnisse lieferten hier *In-Vitro*-Import-Studien von Reinbothe et al. (1997; 2000; 2004b), in denen beispielsweise transA-PORB bzw. ein Fusionsprotein, bestehend aus transA und dem Reporterprotein DHFR (Dihydrofolatreduktase; ein cytosolisches Protein aus Maus), Pchlid-abhängig sowohl in Etioplasten als auch in mit 5-ALA vorbehandelte Chloroplasten importiert wurde.

Die von Kim und Apel (2004) *in vivo* beobachtete Pchlid-Abhängigkeit des pPORA-Imports schien jedoch allein auf Kotyledonen beschränkt zu sein, denn auch in Abwesenheit von Pchlid translozierten Chloroplasten aus grünen Blättern adulter Pflanzen das pPORA-GFP-Fusionsprotein. Der Unterschied im Importmechanismus in Kotyledonen und grünen, reifen Blättern (Rosettenblättern) liegt in der Existenz einer Gruppe von 14:3:3-Proteinen begründet, die gemeinsam mit einem Hitzeschockprotein (70 kDa) einen Komplex mit dem PORA-Vorstufenprotein bilden, der wiederum mit dem Toc-Komplex der Tic/Toc-Maschinerie interagiert. Der entsprechende Vertreter der 14:3:3-Proteine kommt nicht in Kotyledonen, sondern nur in reifen, grünen Blättern (*true leaves*) vor, was das differentielle Importverhalten von pPORA (Schemenewitz et al., 2007) erklärt.

Im Gegensatz dazu erfolgt der Import von pPORB, unabhängig von intraplastidär vorhandenem Pchlid, in gleichem Umfang in Etioplasten und Chloroplasten (Reinbothe et al., 1995b; 1997), was durch die fehlende Pchlid-Bindungsstelle im Transit-Peptid von pPORB erklärt werden kann.

Des Weiteren ist auffällig, dass pPORA während seiner Pchlid-abhängigen Translokation nicht wie pPORB über den bereits beschriebenen Standard-Protein-Import-Apparat (Tic/Toc-Komplex) aufgenommen wird (Keegstra und Cline, 1999; Schleiff und Soll, 2000), sondern durch eine andere Import-Maschinerie, den sog. PTC-Komplex (*Protochlorophyllide dependent translocon complex*), ins Stroma des Chloroplasten gelangt (Reinbothe et al., 2000).

Der PTC-Komplex: Ein weiterer Protein-Import-Apparat

Mit Hilfe des *In-Vitro*-Imports von ³⁵S-pPORA-(His)₆ in Gerste-Chloroplasten gelang es Reinbothe und Mitarbeitern (2004a; b) den Pchlid-enthaltenden, ca. 600 kDa schweren „*junction*“-Komplex (Importkomplex) zwischen äußerer und innerer Plastidenhülle sowohl durch eine milde Solubilisierung als auch mit Hilfe chemischer *Crosslinking*-Experimente zu isolieren und dessen Komponenten mittels einer zweidimensionalen gelelektrophoretischen

Trennung zu separieren. Während des substratabhängigen pPORA-Imports interagierten innerhalb dieser oligomeren Struktur mindestens 10-12 verschiedene Polypeptide miteinander, die nicht dem Tic/Toc-Komplex zugeordnet werden konnten. Mengenmäßig dominierten hier vier Proteine mit einer molekularen Masse von 52, 47, 33 und 16 kDa, die in nahezu stöchiometrischem Verhältnis zu pPORA vorlagen. Nachdem die Spezifität der beobachteten Interaktion zwischen dem Vorstufenprotein und diesen Polypeptiden anhand verschiedener Kontrollexperimente bestätigt worden war, wurden die Komponenten der Import-Maschinerie, im Folgenden als PTC52, PTC47, PTC33 und PTC16 bezeichnet, sequenziert, um durch vergleichende Analysen mit verfügbaren Datenbanken Rückschlüsse auf deren Identität bzw. vermeintliche Funktionen ziehen zu können.

Das 16 kDa schwere Protein **PTC16**, das als *Crosslink*-Partner von transA (Reinbothe et al., 2004a) identifiziert werden konnte, zeigte dabei eine große Sequenzähnlichkeit zu einem Protein der äußeren Chloroplastenhülle von Gerste (Baldi et al., 1999) und Erbse (Pohlmeyer et al., 1997), wo es als Oep16 (*outer envelope protein*) bezeichnet wird. Eng verwandte Proteine finden sich darüber hinaus in Weizen und *Arabidopsis thaliana*, was auf eine universelle Konservierung des pPORA-Importwegs sowohl in monokotylen als auch in dikotylen Pflanzen hindeutet (Reinbothe et al., 2004b). Wie weitere Datenbankanalysen zeigten, gehört Oep16 zu einer Proteinfamilie, deren Mitglieder am Transport von Präkursor-Proteinen und Aminosäuren beteiligt sind und die sowohl in frei lebenden Bakterien als auch in endosymbiontischen Mitochondrien und Chloroplasten nachgewiesen werden konnten (Rassow et al., 1999).

Die für **PTC33** erhaltene, partielle Aminosäuresequenz erstreckte sich bei *Arabidopsis thaliana* über einen Bereich, in dem sich die beiden Proteine der äußeren Plastidenhüllmembran, Toc33 und Toc34, sehr ähnlich sind (Jarvis et al., 1998), während in Gerste-Datenbanken nur ESTs für Toc34-like Proteine existieren (Reinbothe et al., 2004a).

PTC47, die dritte identifizierte Komponente des PTC-Komplexes, ist mit einer Tyrosin-Aminotransferase aus *Arabidopsis thaliana* verwandt (Lopukhina et al., 2001). In Pflanzen und Bakterien ist dieses Enzym, welches den Transfer einer Aminogruppe von Tyrosin auf 2-Oxoglutarat katalysiert, an der Biosynthese von Plastoquinon bzw. α -Tocopherol (= Vitamin E) beteiligt, die gemäß Lichtenthaler et al. (1981) bzw. Soll et al. (1985) innerhalb der Plastidenhülle stattfinden soll. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass PTC47 ein integrales Membranprotein der inneren Chloroplastenhülle ist (Reinbothe et al., 2004a), was seine vermeintliche Funktion als Tyrosin-Aminotransferase untermauert. Durch Co-Immunpräzipitation wurde auch eine Wechselwirkung dieses Proteins mit dem noch

fehlenden, 52 kDa schweren Bestandteil des pPORA-spezifischen Import-Apparates, PTC52, nachgewiesen (Reinbothe et al., 2004a).

PTC52 und andere Mitglieder der Familie der Rieske-Typ Eisen-Schwefel-Proteine in der Plastidenhülle

PTC52: Ein Mitglied der Familie der Rieske-Typ Eisen-Schwefel-Proteine

Entsprechend den durchgeführten Datenbankanalysen stimmte die partielle Aminosäuresequenz von PTC52 aus Gerste mit dem EST-Klon: BF266467 überein und wies eine große Ähnlichkeit zur vorhergesagten Sequenz des Genprodukts von At4g25650 von *Arabidopsis thaliana* (AtPTC52) auf. Weitere phylogenetische Untersuchungen zeigten, dass AtPTC52 zu einer Familie von pflanzlichen bzw. bakteriellen non-Häm Oxygenasen zählt (Caliebe et al., 1997; Gray et al., 2004; Gross und Bhattacharya, 2008), deren Mitglieder sich durch das Vorhandensein von zwei hoch-konservierten funktionellen Motiven auszeichnen:

- 1.) Konsensus-Sequenz zur Koordination eines Rieske-Typ [2Fe-2S]-Clusters (Mason und Cammack, 1992):

C-x-H-x₁₆₋₁₇-C-x₂-H

- 2.) Mononukleare non-Häm Eisen-Bindungsdomäne (Jiang et al., 1996):

N-x₂-D-x₃₋₄-H-x₄-H

Als weitere Mitglieder dieser Proteinfamilie sind Tic55 (*translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts*; Caliebe et al., 1997), CAO (*chlorophyll(id) a oxygenase*; Tanaka et al., 1998; Espineda et al., 1999), das Enzym PAO (*pheophorbide a oxygenase*; Pruzinská et al., 2003), welches mit dem LLS1-Protein (*lethal leaf spot protein*; Gray et al., 1997; 2002) übereinstimmt, und CMO (*choline monooxygenase*; Rathinasabapathi et al., 1997) zu nennen.

Tic55: *translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts*

Das als Bestandteil des Standard-Protein-Import-Apparats der inneren Chloroplastenhülle identifizierte Protein Tic55 scheint aktiv am Transfer von Elektronen beteiligt zu sein. Wie ein Vergleich mit dem Transkriptionsfaktor SoxR deutlich macht, könnte es zusätzlich als Biosensor fungieren (Hidalgo et al., 1997) und somit das Transportgeschehen regulieren. Gemäß Ohnishi et al. (1994) werden die Eisen-komplexierenden Histidin-Reste im Rieske-Typ [2Fe-2S]-Cluster im Verlauf einer Behandlung der Chloroplasten mit Diethyl-

pyrocarbonat ethoxyformyliert, so dass die Translokation von Präkursor-Proteinen durch die innere Hüllmembran zum Erliegen kommt, während deren Bindung an die äußere Plastidenhülle davon unberührt bleibt (Caliebe et al., 1997).

CAO: Chlorophyllid *a* Oxygenase

Auch das Schlüsselenzym der Chl *b* – Biosynthese in *Arabidopsis thaliana*, Chlorophyllid *a* Oxygenase, lässt sich dieser Familie der sog. Rieske-Typ Eisen-Schwefel-Proteine zuordnen (Tanaka et al., 1998; Espineda et al., 1999; Tomitani et al., 1999; Xu et al., 2002).

Genau wie Chl *a* ist auch Chl *b* in allen Landpflanzen sowie in vielen Algen und Cyanobakterien nachweisbar. Im Gegensatz zu Chl *a*, das sowohl im photosynthetischen Reaktionszentrum als auch innerhalb der Licht-Sammel-Antennen vorhanden ist, befindet sich Chl *b* jedoch ausschließlich in den Antennenkomplexen, wo es für deren Größe und damit für die Effizienz der Photosynthese von entscheidender Bedeutung ist (Tanaka et al., 2001). Wie der strukturelle Vergleich beider Pigmente deutlich macht, unterscheiden sich diese allein hinsichtlich einer einzigen Seitenkette an Position 3 (Ring B) voneinander: während bei Chl *a* eine Methylgruppe nachweisbar ist, ist diese bei Chl *b* durch eine Formylgruppe ersetzt (Castelfranco und Beale, 1983). Molekularer Sauerstoff fungiert hier als Lieferant des Formyl-Sauerstoffatoms (Schneegurt und Beale, 1992; Porra et al., 1994), wobei das Enzym Chlorophyll(id) *a* Oxygenase eine ungewöhnliche zweistufige Monooxygenase-Reaktion katalysiert, in deren Verlauf Chlid *a* zu Chlid *b* umgewandelt wird (Oster et al., 2000), welches als direkte Vorstufe von Chl *b* gilt. Mit Hilfe von *In-Planta*-Assays konnten Yamasato und Mitarbeiter (2005) zeigen, dass der N-Terminus des Enzyms dabei nicht nur als Sensor der Chlid *a* – Konzentration fungiert sondern auch die Proteinstruktur stabilisiert.

LLS1: lethal leaf spot protein bzw. PAO: Pheophorbid *a* Oxygenase

Die Entdeckung des *lls1*-Gens geht auf die *lethal leaf spot* – Mutation in *Zea mays* zurück und wurde erstmals von Ullstrup und Troyer 1967 beschrieben. Mutierte Pflanzen zeigten hier, unabhängig von einer vorhergehenden Pathogeninfektion, scheinbar zufällig verteilte, nekrotische Läsionen (*leaf spots*), die sich kontinuierlich, jedoch abhängig vom Blattalter, über das gesamte Blatt bzw. die Pflanze ausbreiteten. Da ähnliche phänotypische Merkmale auch nach Eindringen von *Cochliobolus* (*Helminthosporium*) *carbonum* erkennbar waren, wurde die Mutation der Gruppe der sog. „*disease lesion mimics*“ zugeordnet. Diese größte Klasse innerhalb der „*gain of function*“-Mutationen umfasst in *Zea mays* mindestens 40 Loci

(Walbot et al., 1983; Johal et al., 1995), wobei ähnliche Mutationen auch in anderen Pflanzen, wie beispielsweise *Arabidopsis thaliana* und Gerste, entdeckt und untersucht wurden (Greenberg und Ausubel, 1993; Greenberg et al., 1994; Dietrich et al., 1994; Dangl et al., 1996; Freialdenhoven et al., 1996; Jabs et al., 1996).

Entsprechend den Beobachtungen von Gray und Mitarbeitern führte inaktives LLS1-Protein in Mais-Pflanzen zur Etablierung eines lichtabhängigen, über Chloroplasten vermittelten Zelltodes (Gray et al., 1997; 2002; 2004), so dass das aktive Protein als Suppressor dieses Prozesses betrachtet wurde (Gray et al., 1997). Zwei non-Häm Eisen-Bindungsmotive, die als charakteristisches Merkmal bakterieller, aromatischer Ring-hydroxylierender Enzyme gelten, legten darüber hinaus die Vermutung nahe, dass das *lls1*-Gen eine Oxygenase-Funktion codieren könnte (Gray et al., 1997; 2002; 2004), was durch die Existenz eines zu LLS1 orthologen Proteins in *Arabidopsis thaliana*: ACD1 (*accelerated cell death*) bestätigt werden konnte. Dieses in der inneren Chloroplastenhülle lokalisierte Enzym (Matile und Schellenberg, 1996) katalysiert als Pheophorbid *a* Oxygenase die oxygenolytische Spaltung des Porphyrinrings von Pheophorbid *a* (Pruzinská et al., 2003). Da es nur während der Seneszenz aktiv ist (Ginsburg et al., 1994; Hörtensteiner et al., 1995), wird PAO als Schlüsselenzym des Chlorophyll-Katabolismus betrachtet (Pruzinská et al., 2003).

CMO: Cholin Monooxygenase

Eine 40%ige Sequenzähnlichkeit zu den bereits beschriebenen Mitgliedern der Rieske-Typ Eisen-Schwefel-Proteinfamilie weist auch das Enzym Cholin Monooxygenase aus Spinat auf (Rathinasabapathi et al., 1997), in dessen homologen Untereinheiten jeweils eine konservierte Rieske-Center-Bindungsstelle nachgewiesen wurde (Burnet et al., 1995). Als oligomeres, Ferredoxin-abhängiges Enzym katalysiert CMO die Oxidation von Cholin zu Betain-Aldehyd (Rhodes und Hanson, 1993), einer direkten Vorstufe der weitverbreiteten osmoprotektiven Substanz Glycin-Betain (Yancey, 1994; Gorham, 1995; Papageorgiou und Murata, 1995). Innerhalb der pflanzlichen Oxygenasen nimmt CMO dabei eine Sonderstellung ein, da es weder membrangebunden vorliegt, noch sensitiv gegenüber CO reagiert und sein optisches Spektrum nicht demjenigen eines Häm-Proteins entspricht (Brouquisse et al., 1989; Burnet et al., 1995).

Wie umfangreiche bioinformatische Analysen zeigten, leiten sich PTC52, LLS1/PAO, CAO und Tic55 von einem gemeinsamen cyanobakteriellen Ur-Gen ab, welches Ähnlichkeiten zu *alr4345* aus *Nostoc* sp PCC 7120 zeigt. Die Proteine selbst scheinen sich während des Übergangs hin zu einer Sauerstoffatmosphäre entwickelt zu haben (Gray et al., 2004), in der

sie nun innerhalb des Chlorophyllmetabolismus verschiedene Funktionen übernehmen. Im Gegensatz dazu zeigen Homologe von CMO, die nur in Pflanzen nachgewiesen werden konnten, die engste Verwandtschaft zu aromatischen Ring-hydroxylierenden Enzymen aus Erdbakterien, so dass von einem anderen Ursprung des betreffenden Gens ausgegangen werden muss (Gray et al., 2004).

Um die Funktion des Enzyms Chlorophyllid *a* Oxygenase (CAO) bzw. des Proteins PTC52 detailliert analysieren und voneinander abgrenzen zu können, inwiefern es sich bei beiden Proteinen um Komponenten von Protein-Import-Komplexen handelt, wurden im Rahmen dieser von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützten Arbeit folgende Aufgabenstellungen verfolgt:

- 1.) Analyse der Aktivität der *in vitro* synthetisierten Proteine bzw. ihrer Lokalisation innerhalb von plastidären Multiprotein-Import-Komplexen anhand von *In-Vitro*-Protein-Import-Experimenten.
- 2.) Nachweis der Funktion von CAO bzw. PTC52 beim regulierten Import plastidärer Präkursor-Proteine.
- 3.) *In-Vivo*-Analyse beider Proteine in *Arabidopsis thaliana* knockout-Linien.
- 4.) Identifizierung eines redox-aktiven CxxC-Motivs als Target von Thioredoxinen bei Mitgliedern der Familie der Rieske-Typ Eisen-Schwefel-Proteine z.B. PTC52.
- 5.) Herausstellung der Bedeutung von Thioredoxinen für die Aktivität ihrer Zielproteine und die Kontrolle der Protein-Translokation in Chloroplasten.

Bedeutung des Enzyms Chlorophyllid *a* Oxygenase beim regulierten Import und der Stabilisierung von Chlorophyll *a/b* - Bindungsproteinen des Lichtsammelkomplexes

Grüne Pflanzen decken ihren Energiebedarf, indem sie mit Hilfe der Chlorophylle (Chl) *a* und *b* Lichtenergie absorbieren und diese im Verlauf der Photosynthese in chemische Energie umwandeln. Chl *a* gilt hierbei als Vorstufe von Chl *b*, wobei das Enzym Chlorophyllid *a* Oxygenase (CAO), welches sowohl in *Chlamydomonas* als auch in *Arabidopsis thaliana* nur durch ein einzelnes nukleäres Gen codiert wird, für die schrittweise Chl *b* – Biosynthese verantwortlich ist (von Wettstein et al., 1995; Tanaka et al., 1998; Espineda et al., 1999; Tomitani et al., 1999). Mutanten, wie z.B. *chlorina 1-3* (*chl1-3*), bei denen ein Defekt im CAO-Gen vorliegt, können somit weder Chl *b* noch andere LHC-Proteine akkumulieren (von Wettstein et al., 1974; Tanaka et al., 1998; Espineda et al., 1999), was darauf hindeuten könnte, dass kein weiterer Biosyntheseweg für dieses Pigment existiert. Früheren Überlegungen von Bogoard und Mitarbeitern zu Folge ist jedoch eine Chlorophyll(id) *b* – Synthese auch aus Pchlid *b* denkbar (Bogoard et al., 1967). Da Pchlid *b* allerdings *in planta* offensichtlich sehr schwer nachweisbar ist, ist die Existenz dieser Möglichkeit der Chl(id) *b*-Biosynthese bislang nicht allgemein akzeptiert. Entsprechend den Analysen von Oster und Mitarbeitern (2000) ist pflanzliches CAO *in vitro* ausschließlich als Chlid *a* Oxygenase aktiv, was im Widerspruch zu den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Xu (2001) steht, die berichteten, dass die Expression von *AtCAO*-cDNA im Cyanobakterium *Synechocystis*, welches über kein CAO-Gen verfügt, sowohl zur Bildung von Chl *b* als auch von geringen Mengen an Pchlid *b* bzw. Pchl *b* führte, wodurch die Existenz eines Chl(id) *b*-Synthesewegs aus Pchl(id) *b* erhärtet wurde.

Die Frage, ob CAO eine Funktion bei der Umwandlung von Pchlid *a* in Pchlid *b* ausübt und somit eine Verzweigung der Chl *b*-Biosynthese bereits auf der Stufe des Pchlids ermöglicht, ist von zentraler Bedeutung für den Porphyrin-Metabolismus. Aus diesem Grund sollte die Analyse der katalytischen Aktivität von CAO ein Schwerpunkt der hier durchgeführten Untersuchungen sein. Des Weiteren sollte die plastidäre Sublokalisierung von CAO bestimmt werden. Analysen von Eggink und Hooper folgend ist der Import des Vorstufenproteins von LHCII (pLHCII) bzw. CP29 (pCP29) in die Plastiden nur in Anwesenheit von Chl(id) *b* möglich (Eggink und Hooper, 2000). Die Bindung von Chl(id) *b* an die beiden Vorstufenproteine in der Plastidenhülle wäre, entsprechend der Theorie von Eggink und Hooper, notwendig, um beide Präkursor in der Plastidenhülle zu fixieren und somit ein „*retrograde*

movement“ ins Cytosol zu verhindern. Wenn diese Annahme korrekt ist, müsste CAO in der Plastidenhüllmembran lokalisiert sein und sich dort in unmittelbarer räumlicher Nähe zum Importapparat, der Tic/Toc-Maschinerie, befinden. Darüber hinaus sollte die Frage beantwortet werden, ob CAO und PTC52 identische Funktionen ausüben bzw. inwieweit sie sich in ihrer physiologischen Funktion voneinander unterscheiden (**siehe Reinbothe et al., 2006**).

Zur Funktionsanalyse wurde CAO zunächst *in vitro* synthetisiert. Das gebildete, ca. 52 kDa schwere CAO-Protein wurde mit Chlid *a*, O₂, Ferredoxin (Fd) und einem Fd-reduzierenden System inkubiert. Es konnte gezeigt werden, dass es als Chlid *a* Oxygenase aktiv ist, wobei gebildetes Chlid *b* auf Grund seiner charakteristischen Absorptionsmaxima und mit Hilfe der Massenspektroskopie identifiziert wurde. Gegenüber Pchlid *a* wies CAO – in Übereinstimmung mit Befunden von Xu et al. (2001) – lediglich eine geringe Aktivität auf. Um sowohl die plastidäre Sublokalisierung von CAO als auch dessen Membranbindung zu analysieren, wurden *In-Vitro*-Import-Experimente mit [³⁵S]-markiertem pCAO und isolierten, ATP-verarmten Gersten- bzw. *Arabidopsis*-Chloroplasten in Anwesenheit verschiedener, genau definierter Nukleotidkonzentrationen durchgeführt. Dabei konnte ³⁵S-CAO sowohl in den Thylakoiden als auch in der inneren Hüllmembran der Chloroplasten nachgewiesen werden, wo es durch eine α -Helix bzw. ein β -Faltblatt an die Lipid-Doppelschicht gebunden vorlag.

Wie bereits beschrieben, ist der Import von pPORA in Gersten- und *Arabidopsis*-Kotyledonen von intraplastidär vorhandenem Pchlid abhängig (Reinbothe et al., 1995a; 2004a; Kim und Apel, 2004) und kommt während des Ergrünens etiolierter Keimlinge auf Grund des Licht-induzierten Rückgangs der Pigmentmenge zum Erliegen. *In planta* (in etiolierten, 5 Tage alten Gerstenkeimlingen mit anschließender 2-stündiger Belichtung) liegt pPORA als Import-Intermediat an die äußere Plastidenhülle gebunden vor. Der pPORA-Import in isolierte Plastiden aus diesem Pflanzenmaterial kann durch deren Inkubation mit 5-Aminolävulinsäure induziert werden (Reinbothe et al., 1997). Während seiner Membran-Passage interagiert pPORA mit Komponenten des PTC-Komplexes und etabliert dabei sog. „*junction*“-Komplexe zwischen äußerer und innerer Plastidenhülle (Reinbothe et al., 2004a). Es wäre denkbar, dass CAO mit dem PTC-Komplex interagiert und auf diese Weise das Importsubstrat, Pchlid *b*, in geringer, jedoch für den Import ausreichender Menge zur Verfügung stellt. Zur Analyse einer möglichen Assoziation von CAO mit PTC-Komplexen wurden etiolierte Gerstenkeimlinge belichtet, die in den Etiochloroplasten enthaltenen Plastidenhüllen voneinander getrennt und mittels Immundekoration charakteristischer Marker-Proteine (Toc75 bzw. Iep36) eindeutig

identifiziert. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, ob sich die zu untersuchenden Membranfraktionen aus äußeren, inneren oder beiden Plastidenhüllen zusammensetzten. Während größere Mengen an pPORA sowohl in der Fraktion der inneren Hüllmembranen als auch innerhalb der „*junction*“-Komplexe nachgewiesen wurden, ergaben sich hier keinerlei Hinweise auf eine Interaktion von CAO mit pPORA bzw. Komponenten des PTC-Komplexes. CAO ist somit mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht für die Bereitstellung des Importsubstrates für den pPORA-Import, Pchlid *b*, relevant.

Zur Identifizierung der plastidären Hüllproteine, die während bzw. nach dem Import von pCAO mit diesem Enzym in Wechselwirkung treten, wurden chemische *Crosslinking*-Studien durchgeführt. Bakteriell exprimiertes pCAO-(His)₆ wurde dabei mit dem durch UV-Licht aktivierbaren *Crosslinker* ¹²⁵I-N-[4-(p-azidosalicyl-amido)-butyl]-3'(2-pyridyldithio)propionamid (¹²⁵I-APDP) derivatisiert (Ma et al., 1996; Kouranov und Schnell, 1997) und in Anwesenheit verschiedener, genau definierter Nukleotidkonzentrationen mit isolierten, ATP-verarmten *Arabidopsis*-Chloroplasten inkubiert, wobei nach einer Verdunkelungsphase die Aktivierung des *Crosslinkers* erfolgte. Als Bezugspunkt dienten parallel durchgeführte Experimente mit ¹²⁵I-APDP-pPORB bzw. ¹²⁵I-APDP-pSSU-Protein A (Kouranov und Schnell, 1997), die über den Tic/Toc-Komplex transloziert werden. Die autoradiographische Detektion ergab für alle Vorstufenproteine ein ähnliches Proteinmuster von drei Haupt-*Crosslinking*-Produkten, die mit Hilfe von Immunpräzipitation bzw. Massenspektroskopie als Toc159, dessen proteolytisches Fragment Toc86 sowie Toc75 identifiziert werden konnten. Des Weiteren wurde auch eine Interaktion zwischen ¹²⁵I-APDP-pCAO-(His)₆ und Toc34 nachgewiesen, die bei den Kontrollen nur sehr schwach erschien. Aus diesen Beobachtungen konnte man schließen, dass pCAO nach seiner cytosolischen Synthese in Form eines größeren Präkursor-Proteins durch die generelle Protein-Import-Maschinerie, die Toc159, Toc75 und Toc34 umfasst, in den Intermembran-Raum transportiert wurde und im Anschluss an seine Prozessierung zumindest teilweise in der inneren plastidären Hüllmembran akkumulierte.

Um die Frage zu klären, ob importiertes, reifes (= prozessiertes) CAO nun an diesen Import-Apparat gebunden blieb oder zu anderen Protein-Komplexen in der Plastidenhülle transferiert wurde, wurde ¹²⁵I-APDP-pCAO-(His)₆ zunächst in isolierte, ATP-verarmte *Arabidopsis*-Chloroplasten importiert. Im Anschluss an die Bestrahlung mit UV-Licht wurden mit dem Präkursor assoziierte Proteine mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Nachdem analoge Experimente mit ¹²⁵I-APDP-pTic55-(His)₆ bzw. ¹²⁵I-APDP-pPTC52-(His)₆ durchgeführt worden waren, erfolgte der Nachweis der gebundenen Proteine durch Autoradiographie, Immundetektion bzw. Massenspektroskopie. Während sowohl für CAO als auch für Tic55

eine Wechselwirkung mit Toc75, Tic40 & Tic20 nachweisbar war, interagierte CAO zusätzlich mit Toc34 und Tic22, woraus sich die Existenz eines neuen Tic-Subkomplexes ableiten ließ, der über CAO in engem Kontakt zur äußeren Plastidenhülle stand. Ein ähnlicher Subkomplex ergab sich auch für Tic55, welches mit Toc75, Toc33, Tic40 und Tic20 assoziiert vorlag. PTC52 wies demgegenüber ein völlig anderes *Crosslinking*-Muster auf, in dem neben Toc33 und Oep16 auch ein ca. 27 kDa schweres Protein als Bindungspartner erkennbar war, was frühere Untersuchungsergebnisse verifizierte, nach denen PTC52, Toc33 (PTC33) und Oep16 (PTC16) bei der Bildung des pPORA-Translocons (PTC-Komplexes) interagieren (Reinbothe et al., 2004a; 2005).

Um zu prüfen, ob der CAO-enthaltende Tic-Subkomplex am regulierten Import von „*light-harvesting*“-Chl *a/b* – Bindungsproteinen beteiligt sein könnte, der – wie bereits erwähnt – als Chl(id) *b*-abhängig postuliert wurde (Eggink und Hooper, 2000), wurden Chloroplasten aus *Arabidopsis*-Wildtyp-Pflanzen bzw. der *Chlorina*-Mutante *chl-3*, die kein funktionelles CAO-Protein exprimiert (Espineda et al., 1998), unter Import-Bedingungen mit *in vitro* synthetisiertem ³⁵S-pLhcb1 (Präkursor des LHCII-Apoproteins) bzw. ³⁵S-pLhcb4 (Präkursor des CP29-Apoproteins) inkubiert und die Menge an jeweils importiertem/prozessiertem bzw. nicht-importiertem, plastidär gebundenem Protein ermittelt, wobei die Translokation des radioaktiv markierten Vorstufenproteins von Plastocyanin (³⁵S-pPC) als Bezugspunkt diente. Während dieser Präkursor in etwa gleichem Umfang in beide Plastidentypen importiert wurde, zeigten *chl-3*-Chloroplasten im Gegensatz zu Wildtyp-Plastiden keine Translokation von ³⁵S-pLhcb1 bzw. ³⁵S-pLhcb4, was auch im Rahmen von „*time-course*“-Analysen bestätigt werden konnte. Um zu klären, ob tatsächlich der Mangel an Chlid *b* in *chl-3*-Chloroplasten für die nicht-detektierbare Translokation von pLhcb1 bzw. pLhcb4 verantwortlich sein könnte, wurde *in vitro* synthetisiertes pLhcb1-(His)₆ bei verschiedenen Nukleotidkonzentrationen in *Arabidopsis*-Wildtyp- und *chl-3*-Chloroplasten importiert und an den Präkursor gebundene, plastidäre Hüllproteine analysiert. Abhängig von der Konzentration an Mg-GTP bzw. Mg-ATP war pLhcb1-(His)₆ bei den Wildtyp-Chloroplasten unterschiedlich stark an Toc159, dessen proteolytisches Fragment Toc86 und Toc75 gebunden, wobei auch endogenes Lhcb1 nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu zeigten *chl-3*-Chloroplasten weder den Import noch die Prozessierung des Präkursors und wiesen damit eine auffallende Korrelation zwischen fehlender CAO und der Anhäufung von nicht-importiertem pLhcb1 auf. Für eine Interaktion von pLhcb1 bzw. Lhcb1 mit PTC52 ergaben sich hier keinerlei Anhaltspunkte.

Zur Überprüfung der *in vitro* mit isolierten Hüllmembranen erlangten Ergebnisse in einem *In-Vivo*-System (*chl-3*-Chloroplasten in intaktem Blattgewebe), wurde Blattmaterial von im Licht-gewachsenen *Arabidopsis*-Wildtyp- bzw. *chl-3*-Pflanzen entnommen und im Dunkeln mit [³⁵S]-Methionin inkubiert, bevor Plastiden isoliert und die radioaktiv markierten, plastidären Proteine extrahiert wurden. Der Nachweis von Lhcb1 & Lhcb4 erfolgte über Immundetektion bzw. Immunpräzipitation, wobei Spuren der beiden ausgereiften Proteine auch in *chl-3*-Chloroplasten nachgewiesen werden konnten. Der Import beider Vorstufenproteine war in Blättern der *chl-3*-Pflanzen zwar dramatisch reduziert ($\approx 0,6$ % der Menge von Wildtyp-Chloroplasten), jedoch nicht vollständig blockiert, wobei beide Proteine in Abwesenheit von Chl(id) *b* mit hoher Wahrscheinlichkeit proteolytischen Abbauprozessen unterworfen waren.

Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass es sich bei CAO um ein intrinsisches Rieske-Typ Eisen-Schwefel-Protein handelt, das sich sowohl in Thylakoidmembranen als auch in der inneren Plastidenhülle befindet, wo es als Teil eines neuen Translocon-Komplexes am Import und der Stabilisierung von Lhcb1 (LHCII) bzw. Lhcb4 (CP29) beteiligt ist. Dabei katalysiert CAO die Umwandlung von Chlid *a* zu Chlid *b*, wohingegen es, verglichen mit PTC52 (siehe auch nächster Abschnitt), nur eine geringe Aktivität gegenüber Pchlid *a*, dem nicht-reduzierten Präkursor von Chlid *a*, aufweist. Somit konnte gezeigt werden, dass CAO und PTC52 in unterschiedlichen Tic-Subkomplexen in der inneren Plastidenhülle vorliegen und dort sehr wahrscheinlich verschiedene physiologische Funktionen ausüben, wobei die spezifische Funktion von PTC52 in der im folgenden Abschnitt zusammengefassten Arbeit detailliert charakterisiert wurde.

Eine Protochlorophyllid (Pchlid) *a* Oxygenase, die am plastidären Import des Vorstufenproteins der NADPH:Protochlorophyllid Oxidoreduktase (POR) A beteiligt ist, besitzt eine essentielle Funktion für das pflanzliche Überleben

Die Translokation des cytosolisch synthetisierten Präkursors der NADPH:Protochlorophyllid Oxidoreduktase A (pPORA) erfolgt – wie bereits erwähnt – nicht über den Standard-Protein-Import-Apparat, sondern über den PTC-Komplex (Reinbothe et al., 2000) und ist von Pchlid *b*, dem Enzym-Substrat, abhängig (Reinbothe et al., 1996; 1997; 2000; 2004a). Biochemische Analysen, die für das PTC52-Protein aus Gerste durchgeführt wurden, deuteten darauf hin, dass PTC52, welches als Komponente dieses Komplexes identifiziert wurde (Reinbothe et al., 2000; 2004a), über eine Pchlid *a* Oxygenase Aktivität verfügt und somit das für den eigentlichen Importvorgang nötige Substrat zur Verfügung stellen könnte (Reinbothe et al., 2004a). Diese katalytische Aktivität sollte zunächst für das homologe PTC52-Protein aus *Arabidopsis thaliana* überprüft werden. Des Weiteren sollte die Funktion des *A. thaliana* PTC52 bei der Pchlid-abhängigen Translokation von pPORA getestet werden. Schließlich sollten „*loss-of-function*“-Mutationen des *Arabidopsis thaliana* PTC52-Gens untersucht werden, um so die Bedeutung dieses Proteins im Verlauf der pflanzlichen Entwicklung, d.h. über den Entwicklungsabschnitt der Ergrünung etiolierter Keimlinge hinaus, zu charakterisieren (**siehe Bartsch et al., eingereicht zur Publikation**).

Ausgehend von der großen Ähnlichkeit zwischen der partiellen Aminosäuresequenz des PTC52-Proteins aus Gerste und der Aminosäuresequenz des von At4g25650 codierten Proteins aus *Arabidopsis thaliana* (AtPTC52) wurde in den Datenbanken nach T-DNA-Mutanten gesucht. Dabei identifizierten wir u.a. eine Mutante aus der SALK-Kollektion (Alonso et al., 2003; SALK_011945), die über eine T-DNA-Insertion 198 bp upstream des Start-Codons des *AtPTC52*-Gens verfügte, was mittels PCR bestätigt wurde. Dieses Mutanten-Allel wird im Folgenden als *Atptc52-1* bezeichnet. Wie *Southern-Blot*-Analysen heterozygoter *AtPTC52-1/Atptc52-1*-Pflanzen zeigten, lag hier nur eine einzige T-DNA-Insertion im *AtPTC52*-Gen vor. Wurden heterozygote *AtPTC52-1/Atptc52-1*-Pflanzen miteinander gekreuzt, so konnte anhand des mit der T-DNA-Insertion verknüpften Kanamycin-Resistenzgens eine Aufspaltung der Nachkommenschaft in 66,3 % Kanamycin-resistente gegenüber 33,7 % Kanamycin-sensitiven Pflanzen ermittelt werden, was darauf schließen ließ, dass der *knockout* des Gens für die Pflanzen letal ist. Die visuelle Begutachtung der Schoten bzw. der darin enthaltenen Samen zeigte, dass sich ca. ¼ der

Samen nicht entwickeln konnten und die Embryonen bereits in einem sehr frühen Entwicklungsstadium abgestorben waren. Die gleichen Beobachtungen wurden auch für eine T-DNA-Insertionslinie aus der Syngenta-Kollektion (Garlic_148_H05.b.1a.Lb3Fa, SAIL_148.HC5) gemacht, was die Annahme bestätigte, dass *Atptc52* Null-Mutanten letal sind. Zur Analyse der Funktion von PTC52 *in planta* wurden daher alle nachfolgenden Untersuchungen mit heterozygoten *AtPTC52-1/Atptc52-1*-Pflanzen durchgeführt.

Verglichen mit dem Wildtyp ergrünten die heterozygoten *AtPTC52-1/Atptc52-1*-Pflanzen deutlich langsamer, wobei ältere Keimlinge empfindlicher gegenüber Licht reagierten als jüngere Pflanzen. Dies spiegelte sich ebenfalls in den Chlorophyll-Mengen wider, die nach der Belichtung mit geringen Lichtintensitäten ($5 \mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen um ca. 60 %, bei hohen Intensitäten ($125 \mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) sogar um ca. 90 % reduziert waren.

Auch der Gehalt an beiden POR-Enzymen war bei heterozygoten *AtPTC52-1/Atptc52-1*-Pflanzen und dem Wildtyp unterschiedlich. Während im Verlauf der Belichtung bei Wildtyp-Pflanzen allein die Menge an PORA sank, war bei *AtPTC52-1/Atptc52-1*-Pflanzen zusätzlich ein deutlicher Rückgang der PORB-Menge zu verzeichnen. Darüber hinaus verfügten heterozygote *AtPTC52-1/Atptc52-1*-Pflanzen über weniger LHPP-Komplexe, was die hohe Lichtempfindlichkeit dieser Pflanzen erklärte. Anhand von Pigment-Analysen konnte außerdem gezeigt werden, dass in den Mutanten deutlich mehr Pchlid *a* vorhanden war, was mit einem veränderten Verhältnis von Chl *b* zu Chl *a* bzw. einer Verringerung der LHCII-Mengen zu Beginn des Ergrünens einherging.

Weitere Unterschiede ergaben sich im Rahmen von *In-Vitro*-Import-Analysen. Während ^{35}S -pPORB in beide Plastidentypen in etwa gleichem Umfang transloziert wurde, zeigten die Organellen heterozygoter Pflanzen deutlich verringerte Importraten von ^{35}S -pPORA (ca. 10 % des Wildtyp-Werts) bzw. ^{35}S -pLhcb1 (ca. 50 % des Wildtyp-Werts), was in geringerem Umfang auch *in vivo* während des Ergrünens beobachtet und durch die Abhängigkeit des pLhcb1-Imports von Chlid *b* erklärt werden konnte (**siehe Reinbothe et al., 2006**).

Die Identifizierung eines N-terminalen Transit-Peptids im Genprodukt von At4g25650 ließ darauf schließen, dass AtPTC52 im Cytosol als größeres Vorstufenprotein synthetisiert und anschließend in den Plastiden transloziert wird. Sein vorhergesagter pI-Wert von 8,9 deutete weiterhin auf eine Lokalisation als integrales Membranprotein in der inneren Plastidenhülle hin (Ferro et al., 2002; 2003), was auch durch die postulierte Anwesenheit einiger Transmembransegmente unterstützt wurde.

Um zuerst die katalytische Aktivität von AtpPTC52 bzw. AtPTC52 zu testen, wurden die entsprechenden cDNAs in Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin im *In-Vitro*-Translationssystem aus Weizenkeimen exprimiert. Dabei gebildete Proteine mit einem Molekulargewicht von 57 kDa (= AtpPTC52) bzw. 52 kDa (= AtPTC52) wurden anschließend mit Pchlid *a*, O₂, Fd und einem Fd-reduzierenden System versetzt, wobei beide als Pchlid *a* Oxygenase aktiv waren, was im Rahmen von HPLC-Analysen verifiziert werden konnte. Die Identifizierung des gebildeten Pigments erfolgte hier sowohl über Absorptionsmessungen (Bestimmung charakteristischer Absorptionsmaxima) als auch über „*matrix-assisted laser desorption/ionization spectroscopy*“.

Im nächsten Schritt sollte die plastidäre Lokalisierung von AtPTC52 untersucht werden. Wie *In-Vitro*-Import-Analysen zeigten, erfolgte die Translokation von AtpPTC52 wie die anderer Vorstufenproteine energieabhängig. Während ohne zugefügtes dGTP und dATP nur Spuren des Präkursors in Plastiden-gebundener Form vorlagen, stieg dieser Anteil in Anwesenheit von 0,1 mM Mg-ATP auf 70-80 % an, wobei allein eine Bindung, jedoch keine Insertion in den Import-Apparat der äußeren Plastidenhülle stattgefunden hatte. Diese erfolgte erst in Anwesenheit von 0,1 mM Mg-ATP und 0,1 mM Mg-GTP, was im Widerspruch zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen stand. Erklärbar ist dies dadurch, dass hier sowohl bei der Plastiden-Isolierung als auch während der eigentlichen Importreaktion (Inkubation des Vorstufenproteins mit den isolierten Plastiden) Sorbitol durch Sucrose ersetzt worden war, wodurch Anlagerungen von Proteinen an Membranen stabilisiert werden konnten (vgl. Crowe und Crowe, 1984; Crowe et al., 1984). Darüber hinaus war keine proteolytische Spaltung des Rezeptor-Proteins Toc159 zu beobachten, was ebenfalls zur hohen Bindungseffizienz beigetragen haben könnte. Nach der Erhöhung der Mg-ATP-Konzentration auf 2,0 mM wurde AtpPTC52 teilweise importiert und prozessiert, so dass das 52 kDa schwere Protein nachweisbar war. In Übereinstimmung mit den neuesten Forschungsergebnissen von Inoue und Akita (2008) erfolgte auch hier der eigentliche Importvorgang unabhängig von Mg-GTP.

Die intraplastidäre Lokalisation von AtPTC52 wurde im Anschluss an den *In-Vitro*-Import von ³⁵S-AtpPTC52 analysiert, nachdem an die Plastiden gebundene, jedoch nicht importierte Präkursor-Proteine mittels Thermolysin verdaut worden waren. Nach hypertotonischer Lyse wurden die Plastiden in Thylakoide, Stroma, äußere und innere Hüllmembranen fraktioniert, wobei zur Identifizierung der einzelnen Fraktionen sowie zur Überprüfung von deren Reinheit auf die Immundekoration spezifischer Markerproteine zurückgegriffen wurde. Transloziertes ³⁵S-AtPTC52 co-fraktionierte dabei ausschließlich mit Tic110 und zeigte keinerlei Interaktionen mit Komponenten anderer plastidärer Fraktionen. Wurden innere Hüllmembranen im

Anschluss an die Import-Reaktion mit 0,1 M Na₂CO₃ (pH 11) oder 1 M NaCl extrahiert, so fand sich das radioaktiv-markierte Protein ausschließlich im Membranpellet der Plastiden. Bei AtPTC52 handelt es sich demzufolge mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein intrinsisches Membranprotein der inneren Plastidenhülle, was auch mit seiner vorhergesagten Struktur und der Anwesenheit von bis zu vier möglichen Transmembransegmenten in Einklang steht.

Wie Pilot-Experimente gezeigt hatten, konnte AtPTC52-(His)₆ nach seiner Translokation in Gerste-Chloroplasten größere Komplexe bilden, was mittels *In-Vitro*-Import-Experimenten verifiziert werden sollte. Gebildete Protein-Importkomplexe wurden dissoziiert und einzelne Komponenten durch nicht-denaturierende SDS-PAGE bzw. *Western-Blotting* detektiert. Neben bereits bestehenden PTC-Komplexen konnten neu gebildete, AtPTC52-(His)₆-enthaltende Proteinkomplexe detektiert werden, deren Anteil proportional zur Konzentration des translozierten Präkursors war. Wurden beispielsweise 2,5 nmol AtpPTC52-(His)₆ importiert, so konnten immunchemisch zwei Proteinbanden (Bande I & II) verschiedener Intensitäten nachgewiesen werden, die im Anschluss an ihre zweidimensionale Trennung unterschiedliche Proteinmuster aufwiesen. Während Bande II nur einen einzigen Proteinspot lieferte, war bei Bande I ein komplexes Muster von Proteinen zu erkennen, welches sich aus PTC47, PTC33, PTC16/Oep16 und drei anderen Spots mit molekularen Massen von 27 kDa, 22 kDa bzw. 20 kDa zusammensetzte. Dabei war auffällig, dass die Menge an AtPTC52-(His)₆ i.vgl. zu den anderen Proteinkomponenten in etwa doppelt bis viermal so groß war, so dass von insgesamt schwachen Wechselwirkungen zwischen den Proteinen in Abwesenheit von pPORA, dem eigentlichen Import-Substrat, ausgegangen werden musste. Wurde AtpPTC52-(His)₆ dagegen in Etiochloroplasten importiert, so wurden deutlich höhere Mengen an PTC130, PTC33 und PTC16 nachgewiesen, was den stabilisierenden Einfluss von pPORA, das hier teilweise innerhalb der Hüllmembranen akkumulierte (siehe Reinbothe et al., 1996a; 2000; **siehe Reinbothe et al., 2006**), bei der Bildung des PTC-Komplexes unterstrich (siehe Reinbothe et al., 2004a; 2005). Bande II repräsentierte demgegenüber mit hoher Wahrscheinlichkeit endogenes Gersten-PTC52, welches infolge des Überschusses an zugefügtem AtPTC52-(His)₆ aus existierenden PTC-Komplexen freigesetzt worden war und nicht mit anderen Proteinen in Wechselwirkung trat. Die Beobachtungen stimmten auch mit den Ergebnissen einer Größen-Ausschluss-Chromatographie überein, die für Bande I, den PTC-Komplex, ein Molekulargewicht von ca. 650 kDa, für Bande II (PTC52) von ca. 50 kDa lieferte.

Um die Interaktion von AtPTC52 mit pPORA zu bestätigen, wurden *Crosslinking*-Experimente mit Dithiobis(succinidyl propionat) (DSP; Lübeck et al., 1996) durchgeführt, in deren Verlauf radioaktiv-markiertes pPORA-(His)₆ in Gersten-Chloroplasten transloziert (0,1 mM Mg-ATP und 0,1 mM Mg-GTP) wurde. ³⁵S-pPORA induzierte hier die Bildung eines ca. 600 kDa schweren, PTC52-enthaltenden Komplexes. Wurden die Experimente ohne DSP wiederholt, so konnte allein ein Produkt von ca. 60 kDa detektiert werden, in welchem pPORA durch starke Wechselwirkungen mit PTC16/Oep16 verbunden war. In einer parallelen Analyse wurde der Import von ³⁵S-pPORB, ³⁵S-pSSU bzw. ³⁵S-pFd verfolgt. Dabei konnte gezeigt werden, dass importiertes ³⁵S-pPORB, ³⁵S-pSSU bzw. ³⁵S-pFd nicht mit PTC52-Antiseren co-immunpräzipitierte, sondern stattdessen eine Interaktion mit Toc75 aufwies.

Bei früheren Analysen des Protein-Imports durch den Tic/Toc-Komplex machten Ohnishi et al. (1994) die Beobachtung, dass die Translokation durch die innere Hüllmembran nach der Behandlung der Chloroplasten mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) zum Erliegen gekommen war, wofür sie strukturelle Veränderungen der im Rieske-Typ [2Fe-2S]-Cluster konservierten His-Reste von Tic55 verantwortlich machten. Da PTC52 ebenfalls zur Familie der Rieske-Typ Fe-S-Proteine gezählt wird, könnte DEPC auch hier eine ähnliche Wirkung auf den Protein-Import durch den PTC-Komplex entfalten. In welchem Umfang sich nun vorhandenes DEPC auf die Translokationsrate auswirkte, wurde anhand vergleichender *In-Vitro*-Import-Analysen mit ³⁵S-pPORA (= PTC52-Import-Substrat; Reinbothe et al., 2004a; 2005) bzw. den Tic55-Import-Substraten ³⁵S-pSSU, ³⁵S-pPORB und ³⁵S-pFd (Caliebe et al., 1997; **siehe Reinbothe et al., 2006**) untersucht. Um das für den pPORA-Import notwendige Pchlid zur Verfügung zu stellen, wurden Chloroplasten aus Gerste bzw. *Arabidopsis thaliana* verwendet, die vor der eigentlichen Importreaktion mit der Pchlid-Vorstufe 5-ALA inkubiert worden waren (Reinbothe et al., 1995a). Während geringe DEPC-Konzentrationen (1, 5 bzw. 50 µM) allein die Import-Effizienz von pPORA reduzierten, war dessen Translokation bei

1 mM DEPC zum Erliegen gekommen, wohingegen die Importraten der anderen Präkursor-Proteine nur um durchschnittlich 10 % gesunken waren. Tic55 stellte somit kein primäres Ziel von DEPC dar, was den bereits zitierten Untersuchungsergebnissen widersprach und durch die verwendeten pflanzlichen Spezies (Gerste/*Arabidopsis thaliana* versus Erbse) bzw. experimentellen Bedingungen der Plastiden-Isolierung (Reinbothe et al., 1995a; Lübeck et al., 1996) erklärt werden könnte. Aktivitätsmessungen mit *in vitro* exprimiertem, löslichem AtPTC52 und HvPTC52 bzw. den im PTC-Komplex gebundenen Proteinen verdeutlichten den inhibierenden Einfluss von DEPC und damit eine Beteiligung der konservierten Histidin-

Reste am katalytischen Mechanismus von PTC52 als Pchlid *a* Oxygenase und Teil des PTC-Komplexes, wobei DEPC mit hoher Wahrscheinlichkeit über die Ethoxyformylierung dieser Reste agiert (Ohnishi et al., 1994). Genau wie lösliches AtPTC52 bzw. HvPTC52 benötigen isolierte PTC-Komplexe Fd und ein Fd-reduzierendes System, um Pchlid *a* in Pchlid *b* umzuwandeln. Da jedoch auch in Abwesenheit dieser Additive eine geringe Aktivität der Komplexe detektiert werden konnte, scheinen einige PTC-Protein-Komponenten zu Fd bzw. FNR vergleichbare Funktionen zu besitzen.

Zur Identifizierung von Aminosäuren, die für die jeweilige Substratspezifität der einzelnen Mitglieder der Rieske-Protein-Familie verantwortlich waren, wurden PTC52, CAO, PAO und Tic55 aus zwei Dikotylen (*Arabidopsis thaliana* und *Populus trichocarpa*), zwei Monokotylen (*Oryza sativa* und *Zea mays*) und dem Moos *Physcomitrella patens* mittels multipler Sequenz-Alignments (CLUSTAL W) verglichen, wobei auch CAO aus *Chlamydomonas reinhardtii* und vier verwandte Oxygenasen aus photosynthetischen Bakterien miteinbezogen wurden. Innerhalb variabler Regionen dieser Proteine konnten Motive identifiziert werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit für deren Substratspezifität verantwortlich waren. Die eigentliche Substrat-Bindungsregion ergab sich dabei durch einen strukturellen Vergleich mit der Kristallstruktur der verwandten bakteriellen Naphthalen Dioxygenase aus *Pseudomonas putida* (Kauppi et al., 1998; Karlsson et al., 2003).

Innerhalb der PTC52-Sparte von Landpflanzen konnten so 18, einzig in dieser vermeintlichen Substrat-Bindungsdomäne konservierte Aminosäuren nachgewiesen werden, die in PAO, Tic55 bzw. CAO entweder fehlten oder weniger stark konserviert waren. Darüber hinaus wurden hier vier sog. Signatur-Motive identifiziert, deren Konservierung gegenüber verwandten cyanobakteriellen Motiven jedoch zu schwach war, um ihnen eine eindeutige PTC52- bzw. PAO-Funktion zuzuordnen. Die Alignments zeigten insgesamt eine stärkere Homologie zwischen PTC52 und PAO als zwischen PTC52 und CAO, was unerwartet war, da die enzymatische Aktivität von PTC52 eher derjenigen von CAO ähnelte.

Zusammenfassend konnte anhand der hier durchgeführten Analysen gezeigt werden, dass PTC52 in einem Proteinkomplex der inneren Chloroplastenhülle (= PTC-Komplex) lokalisiert ist, wo es als Pchlid *a* Oxygenase wirkt und so das für den plastidären Import von pPORA essentielle Pchlid *b* zur Verfügung stellt. Die beobachtete starke Konservierung des *PTC52*-Gens in höheren Pflanzen unterstreicht darüber hinaus dessen essentielle Bedeutung während der pflanzlichen Entwicklung, was auch daran deutlich wird, dass „loss-of-function“-

Mutationen dieses Gens für den Embryo letal sind, d.h. die verwandten Rieske-Proteine Tic55, CAO bzw. PAO sind nicht dazu in der Lage, fehlendes PTC52 zu ersetzen.

Drei Thioredoxin-Targets in der inneren Hüllmembran von Chloroplasten besitzen eine Funktion beim Protein-Import und dem Chlorophyll-Metabolismus

Bei Thioredoxinen (Trxs) handelt es sich um kleine, ubiquitäre Proteine, die über eine redox-aktive Disulfid-Brücke verfügen (Schürmann und Jacquot, 2000; Buchanan et al., 2002; Buchanan und Balmer, 2005) und in Chloroplasten bzw. anderen Plastidentypen in den beiden Hauptformen Trx *f* & Trx *m* vorkommen. Charakteristisch ist hier ein konserviertes Sequenzmotiv, in dem zwei benachbarte Cystein-Reste vorhanden sind (Trp-Cys-Gly-Pro-Cys evtl. Trp-Cys-Pro-Pro-Cys) und das als Trx-Signatur bezeichnet wird. In ihrer reduzierten Form fungieren Trx *f* & Trx *m* als sehr effiziente Protein-Disulfid-Oxidoreduktasen und katalysieren zwei Transferreaktionen, in deren Verlauf jeweils ein Elektron auf das Target-Enzym, welches häufig redox-sensitive C(x)_nC-Paare aufweist, übertragen wird. Bevor das Target-Disulfid, z.B. in Enzymen des Calvin-Zyklus und des Pentose-Phosphat-Wegs, jedoch komplett reduziert ist, kommt es zur Bildung einer transienten Heterodisulfid-Bindung zwischen reduziertem Trx und oxidiertem Enzym (Brandes et al., 1996; Goyer et al., 1999; Verdoucq et al., 1999; Balmer und Schürmann, 2001), was zur Durchführung einer Affinitätschromatographie genutzt wird. Ist das im Molekül verborgene, redox-aktive Cystein des Trx-aktiven Motivs durch eine andere Aminosäure ersetzt, so wird das normalerweise transiente Heterodisulfid stabilisiert, d.h. Target-Protein und Trx bleiben kovalent verbunden, können jedoch durch DTT voneinander getrennt werden (Brandes et al., 1996; Balmer und Schürmann, 2001; Balmer et al., 2003; Hisabori et al., 2005).

Innerhalb der hier durchgeführten Untersuchungen sollten Trx-Target-Proteine in beiden Plastidenhüllen identifiziert und charakterisiert werden (**siehe Bartsch et al., 2008**). Als Kandidaten kamen sowohl Tic55 als auch PTC52 und PAO in Frage, die neben konservierten Rieske- und [2Fe-2S]-Clustern auch die Existenz eines CxxC-Motivs teilten, welches sich ca. 73 Aminosäuren entfernt vom jeweiligen C-terminalen Ende befand.

Zu diesem Zweck wurden Trx-Moleküle kreiert, in denen der besagte Cys-Rest der Trx-Signatur durch Serin bzw. Alanin ersetzt worden war. Zur Überprüfung ihrer Reaktivität gegenüber Trx-Targets wurden diese mit dem Stroma aus Gerste-Chloroplasten inkubiert und gebundene Proteine mittels DTT eluiert. Neben Sedoheptulose-1,7-Bisphosphatase konnten hier mit Hilfe der Massenspektroskopie auch Phosphoribulokinase und eine NADP-abhängige Malat-Dehydrogenase nachgewiesen werden, die bereits als Trx-Zielproteine in Spinat-Chloroplasten beschrieben worden waren (Schürmann und Jacquot, 2000; Buchanan und

Balmer, 2005). Zur Extraktion vermeintlicher Trx-Targets innerhalb der beiden plastidären Hüllen wurden diese solubilisiert und in gleicher Weise behandelt. In der äußeren Hüllmembran konnten so neben drei Hauptbanden im Bereich von ca. 40-55 kDa auch mehrere kleinere Proteinbanden nachgewiesen werden, wobei die massenspektroskopische Analyse des dominierenden, ca. 55 kDa schweren Proteins eine enge Verwandtschaft zu zwei Enzymen (Evr1 & Evr2) offenbarte, die in Mitochondrien und Bakterien an der Bildung von Disulfid-Brücken beteiligt sind (Lee et al., 2000; Gerber et al., 2001; Mesecke et al., 2005; Tokatlidis, 2005). In der Fraktion der inneren Hüllmembranen waren demgegenüber fünf Hauptbanden unterschiedlicher Intensität vorhanden, von denen eine Proteinbande bei ca. 52 kDa mengenmäßig klar überwog. Da die Vermutung nahe lag, dass es sich hier um ein Gemisch verschiedener Proteinkomponenten handeln könnte, wurden die Proteine in diesem Bereich (ca. 50-52 kDa) einer zweidimensionalen gelelektrophoretischen Trennung unterzogen, was zur Detektion von sechs Proteinspots mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten bzw. molekularen Massen führte. Mit Hilfe von Mikrosequenz-Analysen konnten drei dieser Spots als Tic55, PTC52 und PAO identifiziert werden. Um deren Bedeutung als mögliche Trx-Targets zu verifizieren, wurden vorhandene Disulfid-Bindungen mit einem NADP/Trx-System reduziert und Veränderungen des Redox-Zustands durch Fluoreszenz gekoppelt mit Gelelektrophorese detektiert. Verglichen mit einer unbehandelten Kontrollprobe wiesen alle drei Proteine einen Anstieg ihrer Fluoreszenz auf, was sie als Trx-Zielpoteine charakterisierte.

Im Rahmen einer hybridelektiven Translation von *PTC52*- bzw. *PAO*-mRNA wurden Unterschiede im Expressionsverhalten zwischen etiolierten, belichteten und im Licht gewachsenen Gersten-Keimlingen analysiert und die Identität der gebildeten Präkursor-Proteine durch Immunpräzipitation bestätigt. Aus der Gesamt-RNA belichteter Pflanzen wurden die entsprechenden Transkripte „gefischt“ und translatiert, wobei die hier nachgewiesenen leichten Größenunterschiede der Proteine mit hoher Wahrscheinlichkeit auf verschiedene Längen der jeweiligen Transit-Peptide zurückzuführen waren. Darüber hinaus beeinflussten die äußeren Lichtverhältnisse das detektierte Expressionsmuster. Während die *PAO*-Transkriptmenge sowohl bei etiolierten, belichteten als auch bei im Licht gewachsenen Pflanzen nahezu unverändert blieb, war die größte Menge an *PTC52*-mRNA in etiolierten Keimlingen nachweisbar, was mittels *Northern-Blotting*, RT-PCR bzw. *Western-Blotting* verifiziert werden konnte.

Im Gegensatz zu *PTC52*, welches – wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben – an der Pchl *b*-Synthese, also am Aufbau von Chlorophyll, beteiligt ist, ist *PAO* nur während der

Blattseneszenz aktiv und katalysiert die Öffnung der Ringstruktur von Pheophorbid *a*. Das dabei gebildete Reaktionsprodukt RCC (*red chlorophyll catabolite*) akkumuliert *in vivo* nicht, sondern wird sofort nach seiner Entstehung durch das Enzym RCC-Reduktase zu pFCC-1 (*primary fluorescent chlorophyll catabolite*) reduziert, welches als einziges Molekül detektiert werden kann. Zur Überprüfung der *in vitro* Aktivität von PAO muss daher dem Reaktionsansatz RCC-Reduktase hinzugefügt werden (Pruzinska et al., 2003). Wurden die im Rahmen der hybridselektiven Translation synthetisierten Gersten-Proteine PTC52 bzw. PAO mit den entsprechenden Enzym-Substraten (Pchlid *a* bzw. Pheophorbid *a*), O₂, Fd, einem Fd-reduzierenden System, Weizenkeimextrakt bzw. mit *in vitro* exprimierter RCC-Reduktase versetzt, so konnte bei PTC52 per HPLC die Bildung von Pchlid *b*, bei PAO entstandenes pFCC-1 detektiert werden. Beide Proteine konnten dabei ausschließlich ihre spezifischen Substrate binden und umsetzen. Die Synthese von Pchlid *b* fand allein unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen statt, wobei fehlender Weizenkeimextrakt die Enzymaktivität von PTC52 herabsetzte, was darauf hindeutete, dass hier Faktoren vorhanden sein mussten, die im Rahmen einer korrekten Faltung auch die Positionierung der Rieske- bzw. [2Fe-2S]-Cluster unterstützten.

Wurden die *in vitro* exprimierten Proteine mit in *E.coli* synthetisiertem Stroma-Trx *m* bzw. DTT versetzt, so war ein Anstieg der Aktivität von PTC52 & PAO auf den 12- bzw. 15-fachen Wert zu verzeichnen. Beide Proteine schienen demzufolge reversiblen Oxidations-/Reduktionsvorgängen, vermittelt durch redox-aktive SH-Gruppen, zu unterliegen, wobei das reduzierte Enzym, verglichen mit der oxidierten Form, aktiver war. Als mögliches Trx-Target könnte dabei das CxxC-Motiv fungieren, das – wie bereits erwähnt – nicht nur in PTC52 und PAO sondern auch in Tic55 zu finden war. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden mutierte Versionen von AtTic55, AtPTC52 und AtPAO *in vitro* synthetisiert, bei denen entweder der erste oder der zweite Cys-Rest im CxxC-Motiv durch Alanin ersetzt worden war. Bei der Inkubation mit Weizenkeimextrakt fungierten alle drei Proteine als „Köder“ und banden geringe Mengen eines kleinen, ca. 12 kDa schweren Proteins, welches mittels Massenspektroskopie und Immundekoration als Trx *h* identifiziert werden konnte. Mit Stroma-Extrakten aus Gersten-Chloroplasten war eine Interaktion mit Trx *f* & Trx *m* zu beobachten, wobei keine Präferenz gegenüber einer Trx-Form zu verzeichnen war.

Unter der Annahme, dass Thioredoxine eine Funktion bei der oxidativen Regulation innehaben könnten (Buchanan und Balmer, 2005), stellten wir auf Grund der bis dahin gemachten Beobachtungen die Hypothese auf, dass Trx die Aktivität seiner Zielproteine, Tic55, PTC52 und PAO, als Reaktion auf oxidativen Stress beeinflussen könnte. Dies sollte

mit Hilfe der *tigrina d12* Mutante aus Gerste verifiziert werden, die bezüglich der Porphyrin-Biosynthese de-reguliert ist (von Wettstein et al., 1974). Wie ihr entsprechendes Ortholog, die „fluorescent“ (FLU) Mutante aus *Arabidopsis* (Meskauskiene et al., 2001; Lee und Apel, 2002), akkumulieren *tigrina d12* – Keimlinge im Dunkeln freies, nicht-Protein-gebundenes Pchlid, welches nach der Belichtung als Photosensitizer fungiert und so die Bildung von Singulett-Sauerstoff auslöst (op den Camp et al., 2003). Werden die Pflanzen dagegen unter kontinuierlichem Weiß-Licht angezogen, so wird gebildetes Pchlid unmittelbar durch POR zu Chlid umgesetzt, so dass nahezu keine reaktiven Sauerstoffspezies entstehen. Reife, grüne Pflanzen, die im Dunkel-Licht-Zyklus kultiviert wurden bzw. nach einer einmaligen Verdunklung (z.B. 8 oder 15 Stunden) belichtet wurden, reagieren mit der Bildung von Blattläsionen und einer Wachstumshemmung, die auf die Auslösung eines genetisch determinierten Zelltod-Programmes (induziert durch Singulett-Sauerstoff) zurückgeführt werden kann (Meskauskiene et al., 2001). Diese Reaktion der *tigrina d12*-Mutante sollte zur Analyse der oxidativen Regulation der Tic55- bzw. PTC52-Aktivität *in planta* und in *In-Vitro*-Assays genutzt werden. Unter der Voraussetzung, dass Tic55, PTC52 und CAO (evtl. auch PAO) an der Protein-Translokation durch die innere Plastidenhülle beteiligt sind (Caliebe et al., 1997; Kühler et al., 2002; Reinbothe et al., 2004a; **Reinbothe et al., 2006**), wurde der Protein-Import als Maß der oxidativen Regulation herangezogen.

In vergleichenden *In-Vitro*-Protein-Import-Studien wurden pSSU (= Tic55-Import-Substrat), pPORA (= PTC52-Import-Substrat; **siehe Bartsch et al., eingereicht zur Publikation**) und pLHCII (= CAO-Import-Substrat; **Reinbothe et al., 2006**) in Chloroplasten aus *tigrina d12* – Pflanzen transloziert, die entweder unter kontinuierlichem Weiß-Licht angezogen oder vor der Plastiden-Isolierung für 14 h verdunkelt bzw. einem Dunkel-Licht-*Shift* (10 h Dunkelheit und 4 h Licht) unterworfen worden waren. Als Kontrolle diente dabei neben pFdI (= Präkursor des photosynthetischen Fd) auch pFdIII (= Präkursor des nicht-photosynthetischen Fd), welches unter kontinuierlichem Weiß-Licht in den Intermembranraum der Chloroplasten sortiert, jedoch im Dunkeln ins Stroma importiert und prozessiert wird (Hirohashi et al., 2001).

Die Importrate von pSSU war bei Chloroplasten von im Licht-gewachsenen Pflanzen deutlich höher als bei Plastiden, die nach einer 14-stündigen Verdunkelungsphase isoliert worden waren. Vergleichbare Ergebnisse lieferten hier auch *In-Vitro*-Import-Experimente mit dem Präkursor des photosynthetischen Fd. In Übereinstimmung mit den zuvor genannten Ergebnissen (Hirohashi et al., 2001) war bei Chloroplasten aus im Licht-gewachsenen Pflanzen keinerlei Import von pFdIII detektierbar, was sich bei der Verwendung von Plastiden aus verdunkelten Pflanzen änderte, die das ausgereifte Protein akkumulierten. Ein

gegenteiliges Verhalten zeigte demgegenüber die Translokation von pPORA. Die hier gemessenen Importraten in Chloroplasten aus verdunkelten Pflanzen waren deutlich höher als jene in Chloroplasten, die aus im Dauerlicht gewachsenen Pflanzen stammten, wobei letztere den Präkursor nur nach einer vorherigen Behandlung mit der Pchlid-Vorstufe 5-ALA translozierten, was wiederum frühere Untersuchungsergebnisse von Reinbothe und Mitarbeitern (2000) bestätigte. Wurden die *Tigrina*-Pflanzen vor der Isolierung der Plastiden einem Dunkel-Licht-*Shift* ausgesetzt, so war weder der Import von pSSU, noch von pFdI, pFdIII oder pPORA nachweisbar. Deutliche Unterschiede zeigte demgegenüber die Translokation von pLHCII, die über den bereits beschriebenen Import-Komplex erfolgte, der mit CAO assoziiert ist. Während die Importraten bei im Licht-gewachsenen i.vgl. zu verdunkelten Pflanzen deutlich höher lagen, zeigte der Dunkel-Licht-*Shift* der Pflanze keinerlei negativen Einfluss auf die Import-Kapazität.

Zusammenfassend konnten hier mit Tic55, PTC52 und PAO drei neue Trx-Targets der inneren plastidären Hüllmembran identifiziert werden, die neben einer konservierten Rieske- und mononuklearen Fe-Bindungsdomäne auch ein CxxC-Motiv aufweisen, welches sich ca. 73 Aminosäuren entfernt von deren jeweiligem C-Terminus befindet. Auf Grund ihrer Interaktion mit Thioredoxinen unterliegen sie einer oxidativen Kontrolle und sind entweder als Komponenten von Import-Maschinerien der inneren Hüllmembran (Tic55 bzw. PTC52) an der Translokation von Vorstufen-Proteinen beteiligt, oder nehmen wie PAO, welches identisch zu LLS1 ist, aktiv am Chlorophyll-Metabolismus teil.

Literatur

- Akita, M., Nielsen, E., Keegstra, K. (1997) Identification of protein transport complexes in the chloroplastic envelope membranes via chemical crosslinking. *J. Cell Biol.* **136**, 983-994
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., *et al.* (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**, 653-657
- Apel, K., Santel, H.-J., Redlinger, T.E., Falk, H. (1980) The protochlorophyllide holochrome of barley. Isolation and characterization of the NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase. *Eur. J. Biochem.* **111**, 251-258
- Apel, K. (1981) The protochlorophyllide holochrome of barley (*Hordeum vulgare* L.). Phytochrome-induced decrease of translatable mRNA coding for the NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase. *Eur. J. Biochem.* **120**, 89-93
- Arakane, K., Ryu, A., Hayashi, C., Masunaga, T., Shinmoto, K., Mashiko, S., Nagano, T., Hirobe, M. (1996) Singlet oxygen ($^1\Delta_g$) generation from coproporphyrin in *Propionibacterium acnes* on irradiation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **223**, 578-582
- Archer, E.K. and Keegstra, K. (1990) Current views on chloroplast protein import and hypotheses on the origin of the transport mechanism. *J. Bioenerg. Biomembr.* **22**, 789-810
- Armstrong, G.A., Runge, S., Frick, G., Sperling, U., Apel, K. (1995) Identification of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductases A and B: a branched pathway for light-dependent chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **108**, 1505-1517
- Asada, K. (1996) Radical production and scavenging in the chloroplasts. In: Baker, NR. (ed) *Photosynthesis and the Environment*, pp. 123-150. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands
- Bainbridge, G., Gokce, I., Lakey, J.H. (1998) Voltage gating is a fundamental feature of porin and toxin β -barrel membrane channels. *FEBS Lett.* **431**, 305-308
- Baldi, P., Grossi, M., Pecchioni, N., Vale, G., Cattivelli, L. (1999) High expression level of a gene coding for a chloroplastic amino acid selective channel protein is correlated to cold acclimation in cereals. *Plant Mol. Biol.* **41**, 233-243
- Baldwin, A., Wardle, A., Patel, R., Dudley, R., Park, S.K., Twell, D., Inoue, K., Jarvis, P. (2005) A molecular-genetic study of the *Arabidopsis* Toc75 gene family. *Plant Physiol.* **138**, 715-733
- Balmer, Y. and Schürmann, P. (2001) Heterodimer formation between thioredoxin *f* and fructose 1,6-bisphosphatase from spinach chloroplasts. *FEBS Lett.* **492**, 58-61
- Balmer, Y., Koller, A., del Val, G., Manieri, W., Schürmann, P., Buchanan, B.B. (2003) Proteomics gives insights into the regulatory function of chloroplast thioredoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 370-375

- Batschauer, A. and Apel, K. (1984) An inverse control by phytochrome of the expression of two nuclear genes in barley (*Hordeum vulgare* L.) *Eur. J. Biochem.* **143**, 593-597
- Bauer, J., Chen, K., Hiltbunner, A., Wehrli, E., Eugster, M., Schnell, D., Kessler, F. (2000) The major protein import receptor of plastids is essential for chloroplastbiogenesis. *Nature* **403**, 203-207
- Beale, S.I. and Weinstein, J.D. (1990) Tetrapyrrole metabolism in photosynthetic organisms. In: Dailey, H.A. (ed) Biosynthesis of heme and chlorophylls, pp. 287-391. New York: McGraw-Hill
- Bédard, J. and Jarvis, P. (2005) Recognition and envelope translocation of chloroplast preproteins. *J. Exp. Bot.* **56**, 2287-2320
- Bédard, J., Kubis, S., Bimanadham, S., Jarvis, P. (2007) Functional similarity between the chloroplast translocon component, Tic40, and the human co-chaperone, Hsp70 – interacting protein (Hip). *J. Biol. Chem.* **282**, 21404-21414
- Benli, M., Schulz, R., Apel, K. (1991) Effect of light on the NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **16**, 615-625
- Bölter, B., May, T., Soll, J. (1998) A protein import receptor in pea chloroplasts, TOC86, is only a proteolytic fragment of a larger polypeptide. *FEBS Lett.* **441**, 59-62
- Bogoard, L. (1967) Chlorophyll biosynthesis. In: Goodwin, T.W. (ed) Chemistry and Biochemistry of plant pigments, Vol. I, pp. 64-148. Academic press, London
- Brandes, H.K., Larimer, F.W., Hartman, F.C. (1996) The molecular pathway for the regulation of phosphoribulokinase by thioredoxin *f. J. Biol. Chem.* **271**, 3333-3335
- Brouquisse, R., Weigel, P., Rhodes, D., Yocum, C.F., Hanson, A.D. (1989) Evidence for a ferredoxin-dependent choline monooxygenase from spinach chloroplast stroma. *Plant Physiol.* **90**, 322-329
- Bruce, B.D. (2001) The paradox of plastid transit peptides: Conservation of function despite divergence in primary structure. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res.* **1541**, 2-21
- Buchanan, B.B., Schürmann, P., Wolosiuk, R.A., Jacquot, J.-P. (2002) The ferredoxin/thioredoxin system: From discovery to molecular structures and beyond. *Photosynth. Res.* **73**, 215-222
- Buchanan, B.B. and Balmer, Y. (2005) Redox regulation: A broadening horizon. *Annu. Rev. Plant Biol.* **56**, 187-220
- Burnet, M., Lafontaine, P.J., Hanson, A.D. (1995) Assay, purification, and partial characterization of choline monooxygenase from spinach. *Plant Physiol.* **108**, 581-588
- Caliebe, A., Grimm, R., Kaiser, G., Lübeck, J., Soll, J., Heins, L. (1997) The chloroplastic protein import machinery contains a Rieske-type iron-sulfur cluster and a mononuclear iron-binding protein. *EMBO J.* **16**, 7342-7350
- Castelfranco, P.A. and Beale, S.I. (1983) Chlorophyll biosynthesis: Recent advances and areas of current interest. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **34**, 241-276

- Chakraborty, N. and Tripathy, B.C. (1992) Involvement of singlet oxygen in 5-aminolevulinic acid-induced photodynamic damage of cucumber (*Cucumis sativus* L.) chloroplasts. *Plant Physiol.* **98**, 7-11
- Chen, K., Chen, X., Schnell, D.J. (2000) Initial binding of preproteins involving the TOC159 receptor can be bypassed during protein import into chloroplasts. *Plant Physiol.* **122**, 813-822
- Chen, X., Smith, M.D., Fitzpatrick, L., Schnell, D.J. (2002) *In vivo* analysis of the role of atTic20 in protein import into chloroplasts. *Plant Cell* **14**, 641-654
- Chiu, C.C. and Li, H.M. (2008) Tic40 is important for reinsertion of proteins from the chloroplast stroma into the inner membrane. *Plant J.* **56**, 793-801
- Choquet, Y. and Wollman, F.A. (2002) Translational regulations as specific traits of chloroplast gene expression. *FEBS Lett.* **529**, 39-42
- Chou, M.L., Fitzpatrick, L.M., Tu, S.L., Budziszewski, G., Potter-Lewis, S., Akita, M., Levin, J.Z., Keegstra, K., Li, H.m. (2003) Tic40, a membrane-anchored co-chaperone homolog in the chloroplast protein translocon. *EMBO J.* **22**, 2970-2980
- Chou, M.L., Chu, C.C., Chen, L.J., Akita, M., Li, H.M. (2006) Stimulation of transit-peptide release and ATP hydrolysis by a cochaperone during protein import into chloroplasts. *J. Cell. Biol.* **175**, 893-900
- Cline, K., Werner-Washburne, M., Lubben, T.H., Keegstra, K. (1985) Precursors to two nuclear-encoded chloroplast proteins bind to the outer envelope membrane before being imported into chloroplasts. *J. Biol. Chem.* **260**, 3691-3696
- Cline, K., Henry, R., Li, C., Yuan, J. (1993) Multiple pathways for protein transport into or across the thylakoid membrane. *EMBO J.* **12**, 4105-4114
- Cline, K. and Henry, R. (1996) Import and routing of nucleus-encoded chloroplast proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 1-26
- Constan, D., Froehlich, J.E., Rangarajan, S., Keegstra, K. (2004) A stromal Hsp100 protein is required for normal chloroplast development and function in *Arabidopsis*. *Plant Phys.* **136**, 3605-3615
- Crowe, L.M. and Crowe, J.H. (1984) Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science* **223**, 701-703
- Crowe, L.M., Mouradian, R., Crowe, J.H., Jackson, S.A., Womersley, C. (1984) Effects of carbohydrates on membrane stability at low water activities. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes* **769**, 141-150
- Dangl, J.L., Dietrich, R.A., Richberg, M.H. (1996) Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* **8**, 1793-1807
- Danon, A. (1997) Translational regulation in the chloroplast. *Plant Physiol.* **115**, 1293-1298
- Deng, X.-W. and Gruissem, W. (1987) Control of plastid gene expression during development: The limited role of transcriptional regulation. *Cell* **49**, 379-387
- Dietrich, R.A., Delaney, T.P., Uknes, S.J., Ward, E.R., Ryals, J.A., Dangl, J.L. (1994) *Arabidopsis* mutants simulating disease resistance response. *Cell* **77**, 565-577

- Douce, R. and Joyard, J. (1990) Biochemistry and function of the plastid envelope. *Annu. Rev. Cell Biol.* **6**, 173-216
- Eggink, L.L. and Hooper, J.K. (2000) Chlorophyll binding to peptide maquettes containing a retention motif. *J. Biol. Chem.* **275**, 9087-9090
- Espineda, C.E., Linford, A.S., Devine, D., Brusslan, J.A. (1999) The *AtCAO* gene, encoding chlorophyll *a* oxygenase, is required for chlorophyll *b* synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10507-10511
- Ferro, M., Salvi, D., Rivière-Rolland, H., Verinat, T., Seigneurin-Berny, D., Grunwald, D., Garin, J., Joyard, J., Rolland, N. (2002) Integral membrane proteins of the chloroplast envelope: Identification and subcellular localization of new transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 11487-11492
- Ferro, M., Salvi, D., Brugière, S., Miras, S., Kowalski, S., Louwagie, M., Garin, J., Joyard, J., Rolland, N. (2003) Proteomics of the chloroplast envelope membranes from *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Cell. Proteomics* **25**, 325-345
- Flügge, U.-I. and Hinz, G. (1986) Energy dependence of protein translocation into chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* **160**, 563-570
- Forreiter, C., van Cleve, B., Schmidt, A., Apel, K. (1990) Evidence for a general light-dependent negative control of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase in angiosperms. *Planta* **183**, 126-132
- Foyer, C.H., Lelandais, M., Kunert, K.J. (1994) Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant.* **92**, 696-717
- Freialdenhoven, A., Peterhänsel, C., Kurth, J., Kreuzaler, F., Schulze-Lefert, P. (1996) Identification of genes required for the function of non-race-specific *mlo* resistance to powdery mildew in barley. *Plant Cell* **8**, 5-14
- Fuks, B. and Schnell, D.J. (1997) Mechanism of protein transport across the chloroplast envelope. *Plant Physiol.* **114**, 405-410
- Gerber, J., Mühlenhoff, U., Hofhaus, G., Lill, R., Lisowsky, T. (2001) Yeast Erv2p is the first microsomal FAD-linked sulfhydryl oxidase of the Erv1p/Alrp protein family. *J. Biol. Chem.* **276**, 23486-23491
- Ginsburg, S., Schellenberg, M., Matile, P. (1994) Cleavage of Chlorophyll-Porphyrin Requirement for Reduced Ferredoxin and Oxygen. *Plant Physiol.* **105**, 545-554
- Gorham, J. (1995) In: Wallsgrove, R.M. (ed) Amino acids and Their Derivatives in Higher Plants, pp. 173-203. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK
- Goyer, A., Decottignies, P., Lemaire, S., Ruelland, E., Issakidis-Bourguet, E., Jaquot, J.-P., Miginiac-Maslow, M. (1999) The internal Cys-207 of sorghum leaf NADP-malate dehydrogenase can form mixed disulphides with thioredoxin. *FEBS Lett.* **444**, 165-169
- Gray, J., Close, P.S., Briggs, S.P., Johal, G.S. (1997) A novel suppressor of cell death in plants encoded by *Lls1* gene of maize. *Cell* **89**, 25-31

- Gray, J., Janick-Buckner, D., Buckner, B., Close, P.S., Johal, G.S. (2002) Light-dependent death of maize *lls1* cells is mediated by mature chloroplasts. *Plant Physiol.* **130**, 1894-1907
- Gray, J., Wardzala, E., Yang, M., Reinbothe, S., Haller, S., Pauli, F. (2004) A small family of LLS1-related non-heme oxygenases in plants with an origin amongst oxygenic photosynthesizers. *Plant Mol. Biol.* **54**, 39-54
- Greenberg, J.T. and Ausubel, F.M. (1993) *Arabidopsis* mutants compromised for the control of cellular damage during pathogenesis and aging. *Plant J.* **4**, 327-341
- Greenberg, J.T., Guo, A., Klessig, D.F., Ausubel, F.M. (1994) Programmed cell death in plants: A pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell* **77**, 551-563
- Griffiths, W.T. (1975) Characterization of the terminal stage of chlorophyll(ide) synthesis in etioplast membrane preparations. *Biochem. J.* **152**, 623-635
- Griffiths, W.T. (1978) Reconstitution of chlorophyllide formation by isolated etioplast membranes. *Biochem. J.* **174**, 681-692
- Griffiths, W.T., Kay, S.A., Oliver, R.P. (1985) The presence and photoregulation of protochlorophyllide reductase in green tissues. *Plant Mol. Biol.* **4**, 13-22
- Griffiths, W.T. (1991) Protochlorophyllide photoreduction. In: Scheer H. (ed) The Chlorophylls, pp. 433-449. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Gross, J. and Bhattacharya, D. (2008) Revaluating the evolution of the Toc and Tic protein translocons. *Trends Plant Sci.* **14**, 13-20
- Gutensohn, M., Schulz, B., Nicolay, P., Flügge, U.-I. (2000) Functional analysis of the two *Arabidopsis* homologues of Toc34, a component of the chloroplast protein import machinery. *Plant J.* **23**, 771-783
- Häuser, I., Dehesh, K., Apel, K. (1984) The proteolytic degradation *in vitro* of the NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Arch. Biochem. Biophys.* **228**, 577-586
- Heins, L., Mehrle, A., Hemmler, R., Wagner, R., Kuchler, M., Hörmann, F., Sveshnikov, D., Soll, J. (2002) The preprotein conducting channel at the inner envelope membrane of plastids. *EMBO J.* **21**, 2616-2625
- Hidalgo, E., Ding, H., Demple, B. (1997) Redox signal transduction via iron-sulfur clusters in the SoxR transcription activator. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 207-210
- Hinnah, S.C., Hill, K., Wagner, R., Schlicher, T., Soll, J. (1997) Reconstitution of a chloroplast protein import channel. *EMBO J.* **16**, 7351-7360
- Hinnah, S.C., Wagner, R., Sveshnikova, N., Harrer, R., Soll, J. (2002) The chloroplast protein import channel Toc75: pore properties and interaction with transit peptides. *Biophys. J.* **83**, 899-911
- Hirohashi, T., Hase, T., Nakai, M. (2001) Maize non-photosynthetic ferredoxin precursor is missorted to the intermembrane space of chloroplasts in the presence of light. *Plant Physiol.* **125**, 2154-2163

- Hirsch, S., Muckel, E., Heemeyer, F., von Heijne, G., Soll, J. (1994) A receptor component of the chloroplast protein translocation machinery. *Science* **266**, 1989-1992
- Hisabori, T., Hara, S., Fujii, T., Yamazaki, D., Hosoya-Matsuda, N., Motohashi, K. (2005) Thioredoxin affinity chromatography: A useful method for further understanding the thioredoxin network. *J. Exp. Bot.* **56**, 1463-1468
- Hörtensteiner, S., Vicentini, F., Matile, P. (1995) Chlorophyll breakdown in senescent cotyledons of rape, *Brassica napus* L.: Enzymatic cleavage of phaeophorbide *a* *in vitro*. *New Phytol.* **129**, 237-246
- Hofmann, N.R. and Theg, S.M. (2005) Chloroplast outer membrane protein targeting and insertion. *Trends Plant Sci.* **10**, 450-457
- Holtorf, H., Reinbothe, S., Reinbothe, C., Bereza, B., Apel, K. (1995) Two routes of chlorophyllide synthesis that are differentially regulated by light in barley (*Hordeum vulgare* L.) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 3254-3258
- Huang, C.Y., Ayliffe, M.A., Timmis, J.N. (2003) Direct measurement of the transfer rate of chloroplast DNA into the nucleus. *Nature* **422**, 72-76
- Inaba, T., Li, M., Alvarez-Huerta, M., Kessler, F., Schnell, D.J. (2003) atTic110 functions as a scaffold for coordinating the stromal events of protein import into chloroplasts. *J. Biol. Chem.* **278**, 38617-38627
- Inoue, H. and Akita, M. (2008) Three sets of translocation intermediates are formed during the early stage of protein import into chloroplasts. *J. Biol. Chem.* **283**, 7491-7502
- Ivanova, Y., Smith, M.D., Chen, K., Schnell, D.J. (2004) Members of the Toc159 import receptor family represent distinct pathways for protein targeting to plastids. *Mol. Biol. Cell* **15**, 3379-3392
- Jabs, T., Dietrich, R.A., Dangel, J.L. (1996) Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science* **273**, 1853-1856
- Jackson, D.T., Froehlich, J.E., Keegstra, K. (1998) The hydrophilic domain of Tic110, an inner envelope membrane component of the chloroplastic protein translocation apparatus, faces the stromal compartment. *J. Biol. Chem.* **273**, 16583-16588
- Jarvis, P., Chen, L.-J., Li, H.-M., Peto, C.A., Fankhauser, C., Chory, J. (1998) An *Arabidopsis* mutant defective in the plastid general protein import apparatus. *Science* **282**, 100-103
- Jarvis, P. and Soll, J. (2001) Toc, Tic, and chloroplast protein import. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res.* **1541**, 64-79
- Jelic, M., Sveshnikova, M., Motzkus, P., Horth, P., Soll, J., Schleiff, E. (2002) The chloroplast import receptor TOC34 functions as preprotein-regulated GTPase. *Biol. Chem.* **383**, 1875-1883
- Jelic, M., Soll, J., Schleiff, E. (2003) Two Toc34 homologues with different properties. *Biochemistry* **42**, 5906-5916
- Jiang, H., Parales, R.E., Lynch, N.A., Gibson, D.T. (1996) Site-directed mutagenesis of conserved amino acids in the alpha subunit of toluene dioxygenase: Potential mononuclear non-heme iron coordination sites. *J. Bacteriol.* **178**, 3133-3139

- Johal, G.S., Hulbert, S.H., Briggs, S.P. (1995) Disease lesion mimics of maize: A model for cell death in plants. *BioEssays* **17**, 685-692
- Joyard, J., Block, M., Pineau, B., Albrieux, C., Douce, R. (1990) Envelope membranes from mature spinach chloroplasts contain a NADPH:protochlorophyllide reductase on the cytosolic side of the outer membrane. *J. Biol. Chem.* **265**, 21820-21827
- Joyard, J., Teyssier, E., Miège, C., Berny-Seigneurin, D., Maréchal, E., Block, M.A., Dorne, A.-J., Rolland, N., Ajlani, G., Douce, R. (1998) The biochemical machinery of plastid envelope membranes. *Plant Physiol.* **118**, 715-723
- Kahn, A. (1968) Developmental physiology of bean leaf plastids III. Tube transformation and protochlorophyll(ide) photoconversion by a flash irradiation. *Plant Physiol.* **43**, 1781-1785
- Kahn, A., Boardman, N.K., Thorne, S.W. (1970) Energy transfer between protochlorophyllide molecules: Evidence for multiple chromophores in the photoactive protochlorophyllide-protein complex *in vivo* and *in vitro*. *J. Mol. Biol.* **48**, 85-101
- Karlsson, A., Parales, J.V., Parales, R.E., Gibson, D.T., Eklund, H., Ramaswamy, S. (2003) Crystal structure of naphthalene dioxygenase: side-on binding of dioxygen to iron. *Science* **299**, 1039-1042
- Kauppi, B., Lee, K., Carredano, E., Parales, R.E., Gibson, D.T., Eklund, H., Ramaswamy, S. (1998) Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase-naphthalene 1,2-dioxygenase. *Structure* **15**, 571-586
- Kay, S.A. and Griffiths, W.T. (1983) Light-induced breakdown of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase *in vitro*. *Plant Physiol.* **72**, 229-236
- Keegstra, K. and Cline, K. (1999) Protein import and routing systems of chloroplasts. *Plant Cell* **11**, 557-570
- Keegstra, K., Olsen, L. J., Theg, S.M. (1989) Chloroplastic precursors and their transport across the envelope membranes. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* **40**, 471-501
- Kessler, F., Blobel, G., Patel, H.A., Schnell, D.J. (1994) Identification of two GTP-binding proteins in the chloroplast protein import machinery. *Science* **266**, 1035-1039
- Kessler, F. and Blobel, G., (1996) Interaction of the protein import and folding machineries in the chloroplast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 7684-7689
- Kessler, F. and Schnell, D.J. (2006) The function and diversity of plastid protein import pathways: a multilane GTPase highway into plastids. *Traffic* **7**, 248-257
- Kim, C. and Apel, K. (2004) Substrate-dependent and organ-specific chloroplast protein import *in planta*. *Plant Cell* **16**, 88-98
- Kleffmann, T., Russenberger, D., von Zychlinski, A., Christopher, W., Sjölander, K., Gruissem, W., Baginsky, S. (2004) The *Arabidopsis thaliana* chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions. *Curr. Biol.* **14**, 354-362
- Kouranov, A. and Schnell, D.J. (1997) Analysis of the interaction of preproteins with the import machinery over the course of protein import into chloroplasts. *J. Cell Biol.* **139**, 1677-1685

- Kouranov, A., Chen, X., Fuks, B., Schnell, D.J. (1998) Tic20 and Tic22 are new components of the protein import apparatus at the chloroplast inner envelope membrane. *J. Cell Biol.* **143**, 991-1002
- Kouranov, A., Wang, H., Schnell, D.J. (1999) Tic22 is targeted to the intermembrane space of chloroplasts by a novel pathway. *J. Biol. Chem.* **274**, 25181-25186
- Kubis, S., Patel, R., Combe, J., Bédard, J., Kovacheva, S., Lilley, K., Biehl, A., Leister, D., Rios, G., Koncz, C., Jarvis, P. (2004) Functional specialization amongst the *Arabidopsis* Toc159 family of chloroplast protein import receptors. *Plant Cell* **16**, 2059-2077
- Küchler, M., Decker, S., Hörmann, F., Soll, J., Heins, L. (2002) Protein import into chloroplasts involves redox-regulated proteins. *EMBO J.* **21**, 6136-6145
- Kung, S.-D. (1977) Expression of chloroplast genomes in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **28**, 401-437
- Lee, J.-E., Hofhaus, G., Lisowsky, T. (2000) *Erv1p* from *Saccharomyces cerevisiae* is a FAD-linked sulphydryl oxidase. *FEBS Lett.* **477**, 62-66
- Lee, K.P., Kim, C., Lee, D.W., Apel, K. (2003) TIGRINA *d*, required for regulating the biosynthesis of tetrapyrroles in barley, is an ortholog of the *FLU* gene of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **553**, 119-124
- Leister, D. (2005) Genomics-based dissection of the cross-talk of chloroplasts with the nucleus and mitochondria in *Arabidopsis*. *Gene* **354**, 110-116
- Leister, D. (2003) Chloroplast research in the genomic age. *Trends Genetics* **19**, 47-56
- Lichtenthaler, H.K., Prenzel, U., Douce, R., Joyard, J. (1981) Localization of prenylquinones in the envelope of spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* **641**, 99-105
- Lopukhina, A., Dettenberg, M., Weiler, E.W., Holländer-Czytko, H. (2001) Cloning and characterization of a coronatine-regulated tyrosine aminotransferase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **126**, 1678-1687
- Lübeck, J., Soll, J., Akita, M., Nielsen, E., Keegstra, K. (1996) Topology of IEP110, a component of the chloroplastic protein import machinery present in the inner envelope membrane. *EMBO J.* **15**, 4230-4238
- Lübeck, J., Heins, L., Soll, J. (1997) Protein import into chloroplasts. *Physiol. Plant.* **100**, 53-64
- Ma, Y., Kouranov, A., LaSala, S.E., Schnell, D.J. (1996) Two components of the chloroplast protein import apparatus, IAP86 and IAP75, interact with the transit sequence during the recognition and translocation of precursor proteins at the outer envelope. *J. Cell Biol.* **134**, 315-327
- Maplestone, E.R. and Griffiths, W.T. (1980) Light modulation of the activity of the protochlorophyllide oxidoreductase. *Biochem. J.* **189**, 125-133
- Margulis, L. (1970) Origin of eukaryotic cells. Yale Univ. Press, New Haven, CT
- Martin, W. and Müller, M. (1998) The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* **392**, 37-41

- Martin, W., Stoebe, B., Goremykin, V., Hansmann, S., Hasegawa, M., Kowallik, K.V. (1998) Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature* **393**, 162-165
- Mason, J.R. and Cammack, R. (1992) The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**, 277-305
- Matile, P. and Schellenberg, M. (1996) The cleavage of phaeophorbide *a* is located in the envelope of barley gerontoplasts. *Plant Physiol. Biochem.* **34**, 55-59
- Matringe, M., Camadro, J.-M., Labbe, P., Scalla, R. (1989) Protoporphyrinogen oxidase as a molecular target for diphenyl ether herbicides. *Biochem. J.* **260**, 231-235
- May, T. and Soll, J. (1999) Chloroplast precursor protein translocon. *FEBS Lett.* **452**, 52-56
- McFadden, G.I. (2001) Chloroplast origin and integration. *Plant Phys.* **125**, 50-53
- Mesecke, N., Terziyska, N., Kozany, C., Baumann, F., Neupert, W., Hell, K., Herrmann, J. M. (2005) A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell* **121**, 1059-1069
- Meskauskiene, R., Nater, M., Goslings, D., Kessler, F., op den Camp, R., Apel, K. (2001) FLU: A negative regulator of chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 12826-12831
- Miras, S., Salvi, D., Ferro, M., Grunwald, D., Garin, J., Joyard, J., Rolland, N. (2002) Non-canonical transit peptide for import into the chloroplast. *J. Biol. Chem.* **277**, 47770-47778
- Miras, S., Salvi, D., Piette, L., Seigneurin-Berny, D., Grunwald, D., Reinbothe, C., Joyard, J., Reinbothe, S., Rolland, N. (2007) Toc159- and Toc75- independent import of a transit sequence-less precursor into the inner envelope of chloroplasts. *J. Biol. Chem.* **282**, 29482-29492
- Mösinger, E., Batschauer, A., Schäfer, E., Apel, K. (1985) Phytochrome control of *in vitro* transcription of specific genes in isolated nuclei from barley (*Hordeum vulgare* L.) *Eur. J. Biochem.* **147**, 137-142
- Mock, H.-P., Keetman, U., Kruse, E., Rank, B., Grimm, B. (1998) Defense responses to tetrapyrrole-induced oxidative stress in transgenic plants with reduced uroporphyrinogen decarboxylase or coproporphyrinogen oxidase activity. *Plant Physiol.* **116**, 107-116
- Mullet, J.E. (1988) Chloroplast development and gene expression. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **39**, 475-502
- Nada, A. and Soll, J. (2004) Inner envelope protein 32 is imported into chloroplasts by a novel pathway. *J. Cell Sci.* **117**, 3975-3982
- Nielsen, O.F. (1974) Photoconversion and regeneration of active protochlorophyll(ide) in mutants defective in the regulation of chlorophyll synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **160**, 430-439

- Nielsen, E., Akita, M., Davila-Aponte, J., Keegstra, K. (1997) Stable association of chloroplastic precursors with protein translocation complexes that contain proteins from both envelope membranes and a stromal Hsp100 molecular chaperone. *EMBO J.* **16**, 935-946
- Oblong, J.E. and Lamppa, G.K. (1992) Precursor for the light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding proteins synthesized in *Escherichia coli* blocks import of the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphat carboxylase/oxygenase. *J. Biol. Chem.* **267**, 14328-14334
- Ohnishi, T., Meinhardt, S. W., von Jagow, G., Yagi, T., Hatefi, Y. (1994) Effect of ethoxyformic anhydride on the Rieske iron-sulfur protein of bovine heart ubiquinol: cytochrome *c* oxidoreductase. *FEBS Lett.* **353**, 103-107
- Olsen, L.J., Theg, S.M., Selman, B.R., Keegstra, K. (1989) ATP is required for the binding of precursor proteins to chloroplasts. *J. Biol. Chem.* **264**, 6724-6729
- Olsen, L.J. and Keegstra, K. (1992) The binding of precursor proteins to chloroplasts requires nucleotide triphosphates in the intermembrane space. *J. Biol. Chem.* **267**, 433-439
- op den Camp, R.G.L., Przybyla, D., Ochsenbein, C., Laloi, C., Kim, C., Danon, A., Wagner, D., Hideg, E., Göbel, C., Feussner, I., Nater, M., Apel, K. (2003) Rapid induction of distinct stress responses after release of singlet oxygen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**, 2320-2332
- Oster, U., Tanaka, R., Tanaka, A., Rüdiger, W. (2000) Cloning and functional expression of the gene encoding the key enzyme for chlorophyll *b* biosynthesis (CAO) from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **21**, 305-310
- Oswald, O., Martin, T., Dominy, P.J., Graham, I.A. (2001) Plastid redox state and sugars: Interactive regulators of nuclear-encoded photosynthetic gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 2047-2052
- Papageorgiou, G.C. and Murata, N. (1995) The unusually strong stabilizing effects of glycine betaine on the structure and function of the oxygen-evolving photosystem II complex. *Photosynth. Res.* **44**, 243-252
- Perry, S.E., Buvinger, W.E., Bennett, J., Keegstra, K. (1991) Synthetic analogues of a transit peptide inhibit binding or translocation of chloroplastic precursor proteins. *J. Biol. Chem.* **266**, 11882-11889
- Perry, S.E. and Keegstra, K. (1994) Envelope membrane proteins that interact with chloroplastic precursor proteins. *Plant Cell* **6**, 93-105
- Pfannschmidt, T. and Liere, K. (2005) Redox regulation and modification of proteins controlling chloroplast gene expression. *Antioxid. Redox. Signal* **7**, 607-618
- Pfannschmidt, T., Nilsson, A., Allen, J.F. (1999) Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature* **397**, 625-628
- Pfisterer, J., Lachmann, P., Kloppstech, K. (1982) Transport of proteins into chloroplasts. Binding of nuclear-coded chloroplast proteins to the chloroplast envelope. *Eur. J. Biochem.* **126**, 143-148

- Pineau, B., Gérard-Hirne, C., Douce, R., Joyard, J. (1993) Identification of the main species of tetrapyrrolic pigments in envelope membranes from spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* **102**, 821-828
- Pohlmeyer, K., Soll, J., Steinkamp, T., Hinnah, S., Wagner, R. (1997) Isolation and characterization of an amino acid-selective channel protein present in the chloroplastic outer envelope membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 9504-9509
- Porra, R.J., Schäfer, W., Cmiel, E., Katheder, I., Scheer, H. (1994) The derivation of the formyl-group oxygen of chlorophyll *b* in higher plants from molecular oxygen. Achievement of high enrichment of the 7-formyl-group oxygen from $^{18}\text{O}_2$ in greening maize leaves. *Eur. J. Biochem.* **219**, 671-679
- Pruzinská, A., Tanner, G., Anders, I., Roca, M., Hörtensteiner, S. (2003) Chlorophyll breakdown: Pheophorbide *a* oxygenase is a Rieske-type iron-sulfur protein, encoded by the *accelerated cell death 1* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 15259-15264
- Rassow, J., Dekker, P.J.T., van Wilpe, S., Meijer, M., Soll, J. (1999) The preprotein translocase of the mitochondrial inner membrane: function and evolution. *J. Mol. Biol.* **286**, 105-120
- Rathinasabapathi, B., Burnet, M., Russell, B.L., Gage, D.A., Liao, P.-C., Nye, G.J., Scott, P., Golbeck, J.H., Hanson, A.D. (1997) Choline monooxygenase, an unusual iron-sulfur enzyme catalyzing the first step of glycine betaine synthesis in plants: Prosthetic group characterization and cDNA cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 3454-3458
- Rebeiz, C.A., Montazer-Zouhoor, A., Hopen, H.J., Wu, S.M. (1984) Photodynamic herbicides: 1. Concept and phenomenology. *Enzyme Microbial. Technol.* **6**, 390-396
- Reinbothe, C., Lebedev, N., Apel, K., Reinbothe, S. (1997) Regulation of chloroplast protein import through a protochlorophyllide-responsive transit peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8890-8894
- Reinbothe, C., Lebedev, N., Reinbothe, S. (1999) A protochlorophyllide-based light-harvesting complex involved in de-etiolation of higher plants. *Nature* **397**, 80-84
- Reinbothe, C., Buhr, F., Pollmann, S., Reinbothe, S. (2003b) *In vitro* reconstitution of light-harvesting POR-protochlorophyllide complex with protochlorophyllides *a* and *b*. *J. Biol. Chem.* **278**, 807-815
- Reinbothe, S. and Parthier, B. (1990) Translational regulation of plastid gene expression in *Euglena gracilis*. *FEBS Lett.* **265**, 7-11
- Reinbothe, S., Reinbothe, C., Heintzen, C., Seidenbecher, C., Parthier, B. (1993) A methyl jasmonate-induced shift in the length of the 5' untranslated region impairs translation of the plastid *rbcL* transcript in barley. *EMBO J.* **12**, 1505-1512
- Reinbothe, S., Runge, S., Reinbothe, C., van Cleve, B., Apel, K. (1995a) Substrate-dependent transport of the NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase into isolated plastids. *Plant Cell* **7**, 161-172

- Reinbothe, S., Runge, S., Reinbothe, C., Apel, K. (1995b) Enzymatic product formation impairs both the chloroplast receptor binding function as well as translocation competence of the NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase, a nuclear-encoded plastid precursor protein. *J. Cell Biol.* **129**, 299-308
- Reinbothe, S., Reinbothe, C., Holtorf, H., Apel, K. (1995c) Two NADPH:protochlorophyllide oxidoreductases in barley: Evidence for the selective disappearance of PORA during light-induced greening of etiolated seedlings. *Plant Cell* **7**, 1933-1940
- Reinbothe, S. and Reinbothe, C. (1996) The regulation of enzymes involved in chlorophyll biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* **237**, 323-343
- Reinbothe, S., Reinbothe, C., Neumann, D., Apel, K. (1996a) A plastid enzyme arrested in the step of precursor translocation *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 12026-12030
- Reinbothe, S., Mache, R., Reinbothe, C. (2000) A second, substrate-dependent site of protein import into chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 9795-9800
- Reinbothe, S., Pollmann, S., Reinbothe, C. (2003a) *In situ* conversion of protochlorophyllide *b* to protochlorophyllide *a* in barley: Evidence for a novel role of 7-formyl reductase in the prolamellar body of etioplasts. *J. Biol. Chem.* **278**, 800-806
- Reinbothe, S., Quigley, F., Gray, J., Schemenewitz, A., Reinbothe, C. (2004a) Identification of plastid envelope proteins required for import of protochlorophyllide oxidoreductase (POR) A into the chloroplast of barley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 2197-2202
- Reinbothe, S., Quigley, F., Springer, A., Schemenewitz, A., Reinbothe, C. (2004b) The outer plastid envelope protein Oep16: Role as precursor translocase in import of protochlorophyllide oxidoreductase A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 2203-2208
- Reinbothe, S., Pollmann, S., Springer, A., James, R.J., Tichtinsky, G., Reinbothe, C., (2005) A role of Toc33 in the protochlorophyllide-dependent plastid import pathway of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase (POR) A into plastids. *Plant J.* **42**, 1-12
- Reumann, S., Davila-Aponte, J., Keegstra, K. (1999) The evolutionary origin of the protein-translocating channel of chloroplastic envelope membranes: identification of a cyanobacterial homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 784-789
- Rhodes, D. and Hanson, A.D. (1993) Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**, 357-384
- Rochaix, J.D. (2001) Posttranscriptional control of chloroplast gene expression. From RNA to photosynthetic complex. *Plant Physiol.* **125**, 142-144
- Santel, H.J. and Apel, K. (1981) The protochlorophyllide holochrome of barley. The effect of light on the NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase. *Eur. J. Biochem.* **120**, 95-103
- Schemenewitz, A., Pollmann, S., Reinbothe, C., Reinbothe, S. (2007) A substrate-independent, 14:3:3 protein-mediated plastid import pathway of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 8538-8543

- Schleiff, E. and Soll, J. (2000) Travelling of proteins through membranes: translocation into chloroplasts. *Planta* **211**, 449-465
- Schneegurt, M.A. and Beale, S.I. (1992) Origin of the Chlorophyll *b* formyl oxygen in *Chlorella vulgaris*. *Biochemistry* **31**, 11677-11683
- Schnell, D.J., Blobel, G., Pain, D. (1991) Signal peptide analogs derived from two chloroplast precursors interact with the signal recognition system of the chloroplast envelope. *J. Biol. Chem.* **266**, 3335-3342
- Schnell, D.J. and Blobel, G. (1993) Identification of intermediates in the pathway of protein import into chloroplasts and their localization to envelope contact sites. *J. Cell Biol.* **120**, 103-115
- Schnell, D.J., Kessler, F., Blobel, G. (1994) Isolation of components of the chloroplast protein import machinery. *Science* **266**, 1007-1012
- Schnell, D.J., Blobel, G., Keegstra, K., Kessler, F., Ko, K., Soll, J. (1997) A consensus nomenclature for the protein-import components of the chloroplast envelope. *Trends Cell Biol.* **7**, 303-304
- Schürmann, P. and Jacquot, J.-P. (2000) Plant thioredoxin systems revisited. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**, 371-400
- Shedbalkar, V.P., Ioannides, I.M., Rebeiz, C.A. (1991) Chloroplast biogenesis. Detection of monovinyl protochlorophyll(ide) *b* in plants. *J. Biol. Chem.* **266**, 17151-17157
- Smith, M.D., Rounds, C.M., Wang, F., Chen, K., Afithile, M., Schnell, D.J. (2004) atToc159 is a selective transit peptide receptor for the import of nucleus-encoded chloroplast proteins. *J. Cell Biol.* **165**, 323-334
- Soll, J., Schultz, G., Joyard, J., Douce, R., Block, M.A. (1985) Localization and synthesis of prenylquinones in isolated outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* **238**, 290-299
- Stahl, T., Glockmann, C., Soll, J., Heins, L. (1999) Tic40, a new „old“ subunit of the chloroplast protein import translocon. *J. Biol. Chem.* **274**, 37467-37472
- Sundqvist, C. and Dahlin, C. (1997) With chlorophyll pigments from prolamellar bodies to light-harvesting complexes. *Physiol. Plant.* **100**, 748-759
- Sugiura, M. (1992) The chloroplast genome. *Plant Mol. Biol.* **19**, 149-168
- Sveshnikova, N., Soll, J., Schleiff, E. (2000) Toc34 is a preprotein receptor regulated by GTP and phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 4973-4978
- Tanaka, A., Ito, H., Tanaka, R., Tanaka, N.K., Yoshida, K., Okada, K. (1998) Chlorophyll *a* oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll *b* formation from chlorophyll *a*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 12719-12723
- Tanaka, R., Koshino, Y., Sawa, S., Ishiguro, S., Okada, K., Tanaka, A. (2001) Overexpression of chlorophyllide *a* oxygenase (CAO) enlarges the antenna size of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **26**, 365-373

- Theg, S.M., Bauerle, C., Olsen, L.J., Selman, B.R., Keegstra, K. (1989) Internal ATP is the only energy requirement for the translocation of precursor proteins across chloroplastic membranes. *J. Biol. Chem.* **264**, 6730-6736
- Theg, S.M. and Geske, F.J. (1992) Biophysical characterization of a transit peptide directing chloroplast protein import. *Biochemistry* **31**, 5053-5060
- Timmis, J.N., Ayliffe, M.A., Huang, C.Y., Martin, W. (2004) Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nature Rev. Genetics* **5**, 123-135
- Tokatlidis, K. (2005) A disulfide relay system in mitochondria. *Cell* **121**, 965-967
- Tomitani, A., Okada, K., Miyashita, H., Matthijs, H.C.P., Ohno, T., Tanaka, A., (1999) Chlorophyll and phycobilins in the common ancestor of cyanobacteria and chloroplasts. *Nature* **400**, 159-162
- Tranel, P.J., Froehlich, J., Goyal, A., Keegstra, K. (1995) A component of the chloroplastic protein import apparatus is targeted to the outer envelope via a novel pathway. *EMBO J.* **14**, 2436-2446
- Tripathy, B.C. and Chakraborty, N. (1991) 5-Aminolevulinic acid induced photodynamic damage of the photosynthetic electron transport chain of cucumber (*Cucumis sativus* L.) cotyledons. *Plant Physiol.* **96**, 761-767
- Ullstrup, A.J. and Troyer, A.F. (1967) A lethal leaf spot of maize. *Phytopathology* **57**, 1282-1283
- Verdoucq, L., Vignols, F., Jacquot, J-P., Chartier, Y., Meyer, Y. (1999) *In vivo* characterization of a thioredoxin *h* target protein defines a new peroxiredoxin family. *J. Biol. Chem.* **274**, 19714-19722
- Villarejo, A., Burén, S., Larsson, S., Déjardin, A., Monné, M., Rudhe, C., Karlsson, J., Jansson, S., Lerouge, P., Rolland, N., *et al.* (2005) Evidence for a protein transported through the secretory pathway *en route* to the higher plant chloroplasts. *Nat. Cell Biol.* **7**, 1224-1231
- Vojta, A., Alavi, M., Becker, T., Hörmann, F., Kuchler, M., Soll, J., Thomson, R., Schleiff, E. (2004) The protein translocon of the plastid envelopes. *J. Biol. Chem.*, **279**, 21401-21405
- von Wettstein, D., Henningsen, K.W., Boynton, J.E., Kannangara, G.C., Nielsen, O.F. (1971) The genetic control of chloroplast development in barley. In: Boardman, N.K., Linnane, A.W. and Smilie, R.M. (eds) *Autonomy and biogenesis of mitochondria and chloroplasts*, pp. 205-223. North-Holland/Amsterdam
- von Wettstein, D., Kahn, A., Nielsen, O.F., Gough, S. (1974) Genetic regulation of chlorophyll synthesis analyzed with mutants in barley. *Science* **184**, 800-802
- von Wettstein, D., Gough, S., Kannangara, C.G. (1995) Chlorophyll Biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 1039-1057
- Walbot, V., Hoisington, D.A., Neuffer, M.G. (1983) Disease lesion mimic mutations. In: Kosuge, T., Meredith, C.P. and Hollaender, A. (eds) *Genetic Engineering of Plants*, pp. 431-442. Plenum Publishing Corp., New York

- Wu, C., Seibert, F.S., Ko, K. (1994) Identification of chloroplast envelope proteins in close physical proximity to a partially translocated chimeric precursor protein. *J. Biol. Chem.* **269**, 32264-32271
- Xu, H., Vavilin, D., Vermaas, W. (2001) Chlorophyll *b* can serve as the major pigment in functional photosystem II complexes of cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 14168-14173
- Xu, H., Vavilin, D., Vermaas, W. (2002) The presence of chlorophyll *b* in *Synechocystis* sp. PCC6803 disturbs tetrapyrrole biosynthesis and enhances chlorophyll degradation. *J. Biol. Chem.* **277**, 42726-42732
- Yamasato, A., Nagata, N., Tanaka, R., Tanaka, A. (2005) The N-terminal domain of chlorophyllide *a* oxygenase confers protein instability in response to chlorophyll *b* accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**, 1585-1597
- Yancey, P.H. (1994) In: Strange, K. (ed) Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation, pp. 81-109. CRC, Boca Raton, FL
- Young, M.E., Keegstra, K., Froehlich, J.E. (1999) GTP promotes the formation of early-import intermediates but is not required during the translocation step of protein import into chloroplasts. *Plant Physiol.* **121**, 237-244

2

**A role for chlorophyllide *a* oxygenase
in the regulated import and stabilization of light-harvesting
chlorophyll *a/b* proteins**

Christiane Reinbothe, Sandra Bartsch, Laura L. Eggink, J. Kenneth Hooper, Judy Brusslan,
Ricardo Andrade-Paz, Julie Monnet, and Steffen Reinbothe

***Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (2006) Vol. 103,
pp. 4777-4782**

3

**A protochlorophyllide (Pchl_{id}) *a* oxygenase involved
in plastid import of NADPH:Pchl_{id} oxidoreductase (POR) A
is essential for plant viability**

Sandra Bartsch, Julie Saksou, Manli Yang, John Gray, Claudia Rossig, Laurence Bolling,
Christiane Reinbothe, Steffen Reinbothe

Submitted for publication in *Plant Physiology*

A protochlorophyllide (Pchl_{id}) *a* oxygenase involved in plastid import of NADPH:Pchl_{id} oxidoreductase (POR) A is essential for plant viability

Sandra Bartsch^{*}, Julie Saksou[†], Manli Yang[%], John Gray[#], Claudia Rossig[†], Laurence Bolling[†], Christiane Reinbothe^{*†}, Steffen Reinbothe^{†¶}

^{*}Universität Bayreuth, Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie, Universitätsstrasse 30, D-95447 Bayreuth, Germany

[†]Laboratoire de Génétique Moléculaire des Plantes, Fédération de recherche en évolution (FRE) 3017, Université Joseph Fourier/Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), CERMO, BP53, F-38041 Grenoble cedex 9, France

[%]Biological Sciences Department, 245 Life Sciences I, Virginia Tech, Blacksburg, VA 24061, USA

[#]Department of Biological Sciences, University of Toledo, 2801 West Bancroft Street, Toledo, OH 43606, USA

[¶]To whom reprint requests should be addressed (e-mail: steffen.reinbothe@ujf-grenoble.fr).

Summary

Higher plants contain a small, 5-member family of non-heme oxygenases defined by the presence of Rieske and mononuclear iron binding domains. Members of this family comprise the inner plastid envelope translocon protein TIC55, pheophorbide *a* oxygenase (PAO), chlorophyllide *a* oxygenase (CAO), choline monooxygenase, and a 52-kDa protein (PTC52) associated with the precursor NADPH:protochlorophyllide (Pchl_{id}) oxidoreductase (pPOR) A translocon. Some of these chloroplast proteins have documented roles in chlorophyll biosynthesis (CAO) and degradation (PAO), and biochemical evidence indicates that PTC52 encodes a Pchl_{id} *a* oxygenase activity. Here we demonstrate that loss-of-function mutations in the *Arabidopsis thaliana* PTC52 gene gave rise to an embryo-lethal phenotype. The requirement for a functional PTC52 in plant cells is explained by biochemical experiments that demonstrate that PTC52 is required for the conversion of Pchl_{id} during the substrate-dependent import pathway of pPORA. The conservation of PTC52 amongst higher plants underscores its essential function during plant development. The identification of a PTC52 homolog in unicellular photosynthetic bacteria suggests that this function has an ancient evolutionary origin.

Introduction

The endosymbiotic theory explains the origin of mitochondria and plastids through the engulfment of bacteria into (proto)eukaryotic cells (Margulis, 1970). Primitive cyanobacteria are generally accepted to represent the ancestral prokaryotes that gave rise to chloroplasts (Gray, 1992). It is estimated that an ancestral organelle, the "protoplastid", may have arisen after ca. 90 % of the total gene transfer from the genome of the cyanobacterial endosymbiont to the host cell nucleus had taken place and after an envelope protein import machinery had evolved that allowed the gene products to be imported back into the semiautonomous photosynthetic organelle (Martin & Müller, 1998; Martin et al., 1998). It was for a long time believed that most of the proteins destined to the primordial chloroplast acquired cleavable NH₂-terminal transit sequences for import (Keegstra et al., 1989). However, recent proteomic studies have led to the result that this view is too simple.

Kleffmann et al. (2004) found that of the 604 chloroplast proteins identified in *Arabidopsis thaliana* only 376 contained predictable NH₂-terminal transit sequences. Of the remainder, 37 were predicted to have a mitochondrial targeting signal, 40 to have a signal peptide for translocation into the endoplasmic reticulum, and 142 to possess no cleavable presequence. Evidence is emerging for the dual targeting of cytosolic proteins to mitochondria and chloroplasts (Peeters and Small, 2001), for the plastid import of transit peptide-less precursors (Miras et al., 2002, 2007; Nada and Soll, 2006), and for the involvement of the endoplasmic reticulum in the import of certain precursors into chloroplasts (Villajero et al., 2005).

Chloroplast precursor proteins containing cleavable NH₂-terminal transit sequences interact with translocon complexes of the outer and inner plastid envelope membranes, called the TOC and TIC machineries (Schnell et al., 1997). Pioneering work performed for pea chloroplasts identified the TOC complex to consist of three core components: TOC159, TOC75, and TOC34 (Perry & Keegstra, 1994; Hirsch et al., 1994; Kessler et al., 1994; Schnell et al., 1994; Tranel et al., 1995; Ma et al., 1996; Kouranov and Schnell, 1997; Bölter et al., 1998a; Chen et al., 2000; Jelic et al., 2002). Likely in concert, these three proteins mediate the recognition, binding and translocation of the cytosolic precursors across the outer plastid envelope membrane (see Bedard and Jarvis, 2005; Hofmann and Theg, 2005; Kessler and Schnell, 2006, for reviews).

Biochemical and molecular genetic studies performed using *A. thaliana* have challenged the view that all of the different transit peptide-containing cytosolic precursors would enter the organelle through the same, TOC159/TOC75/TOC34 import complex. Bauer et al. (2000)

identified two TOC proteins that complement the previously discovered main preprotein receptor protein TOC159. All three proteins share conserved GTP binding domains and membrane anchors but differ in the length of their NH₂-terminal, cytosolically exposed domains implicated in precursor binding (Bauer et al., 2000; Ivanova et al., 2004). A fourth member of this GTP-binding receptor protein family, AtTOC90, was discovered later (Hiltbrunner et al., 2004). Pull-down and genetic assays confirmed that while AtTOC159 is involved in the import of photosynthesis-related precursor proteins, AtTOC120 and AtTOC130 are responsible for the import of other, non-photosynthetic proteins (Smith et al., 2004). Furthermore, it was shown that a TOC regulatory GTP-binding protein consists of twin components, termed AtTOC33 and AtTOC34, which exhibit different precursor specificities and expression patterns during plant development (Jarvis et al., 1998; Gutensohn et al., 2000; Jelic et al., 2003; Kubis et al., 2004). Last but not least, the β -barrel protein TOC75, which establishes a hydrophilic translocation channel through which the majority of the cytosolic precursors are transported across the outer envelope (Hinnah et al., 1997, 2002), is encoded by three genes in *A. thaliana* of which two have different expression patterns and presumed functions (Baldwin et al., 2005). Increasing evidence thus supports the notion of multiple, regulated TOC complexes in the outer chloroplast envelope. The TIC complex is less well characterized than the TOC complex. It consists of at least three core components: TIC110 (Kessler and Blobel, 1996), TIC40 (Wu et al., 1994; Stahl et al., 1999; Chou et al., 2006; Bédard et al., 2007; Chiu and Li, 2008) and a caseinolytic protein (Clp) C-class HSP93 chaperone (Akita et al., 1997; Nielsen et al., 1997; Constan et al., 2004). Other, presumably auxiliary components comprise TIC55 (Caliebe et al., 1997), TIC22 and TIC20 (Kouranov et al., 1998, 1999; Chen et al., 2002), as well as TIC62 (Küchler et al., 2002). TIC55 is an example of a protein associated with higher plant chloroplast protein import for which a cyanobacterial homolog was observed (Caliebe et al., 1997). Phylogenetic analyses revealed that TIC55 belongs to a family of non-heme oxygenase proteins sharing conserved Rieske and mononuclear iron binding domains in plants and bacteria (Caliebe et al., 1997; Gray et al., 2004; Gross and Bhattacharya, 2008). A biochemical function for TIC55 has not yet been determined so its exact role in the TIC complex remains unknown. In addition to TIC55, this family comprises chlorophyll(ide) (Chl[ide]) α oxygenase (CAO) (Espinda et al., 1998; Tanaka et al., 1998), choline monooxygenase (CMO) (Rathinasabapath et al., 1997), pheophorbide α oxygenase (PAO) (Pruzinska et al., 2003) which is identical with the lethal leaf spot protein (LLS1) (Gray et al., 1997, 2002), and a 52-kDa protein associated with the precursor NADPH:protochlorophyllide (Pchl_{ide}) oxidoreductase (pPOR) A translocon complex (PTC; Reinbothe et al., 2004a). A comprehensive bioinformatics study

suggests that PTC52, PAO, CAO, and TIC55 evolved from a cyanobacterial ancestral gene (similar to alr4345 from *Nostoc* sp PCC 7120) whose function may have evolved during the transition to oxygenic photosynthesis (Fig. 1A; see also Gray et al., 2004).

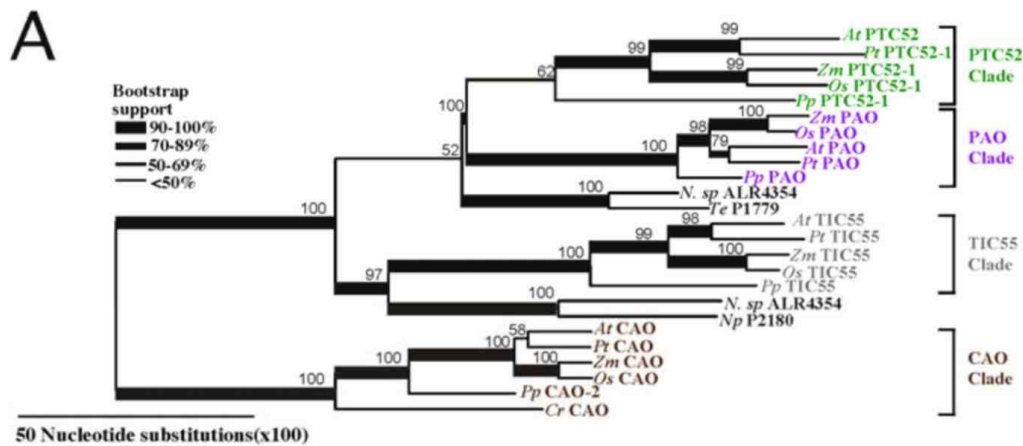


Figure 1. Evolutionary relationships among PTC52 and related land plant and cyanobacterial non heme oxygenases.

(A) Phylogenetic tree of 25 non-heme oxygenases estimated using maximal parsimony. Proteins are named according to their abbreviated species name followed by the gene name (*Arabidopsis thaliana*, At; *Chlamydomonas reinhardtii*, Cr; *Nostoc punctiforme*, Np; *Nostoc species PCC2170*, PCC; *Physcomitrella patens*, Pp; *Populus trichocarpa*, Pt; *Trichodesmium erythraeum*, Te; *Oryza sativa*, Os; *Zea mays*, Zm). A multiple sequence alignment of PTC52-related proteins (see Fig. 1B and Supp. Fig. 15) was determined using Clustal W (default parameters). Branch lengths are proportional to the expected number of nucleotide substitutions. The reliability of each bifurcation was estimated using bootstrap analysis (percentage values over 50 % are shown next to nodes), and the support for each of the branches is indicated by line thickness. The tree is drawn using the chlorophyll oxygenase CAO clade as a monophyletic ingroup.

In contrast, the CMO gene appears to have a separate origin and is more closely related to enzymes in soil bacteria that catabolize aromatic compounds (Gray et al., 2004). In addition to the highly conserved Rieske ($CxHx_{16-17}Cx_2H$) and mononuclear iron binding ($Nx_2Dx_{3-4}Hx_4H$) motifs, PTC52, PAO and TIC55 proteins from different plant species share the presence of a conserved, CxxC motif reminiscent of thiolreductases at approximately 73 amino acids from the carboxy terminus which is also found in homologs from *Nostoc* and other cyanobacteria (Fig. 1B).

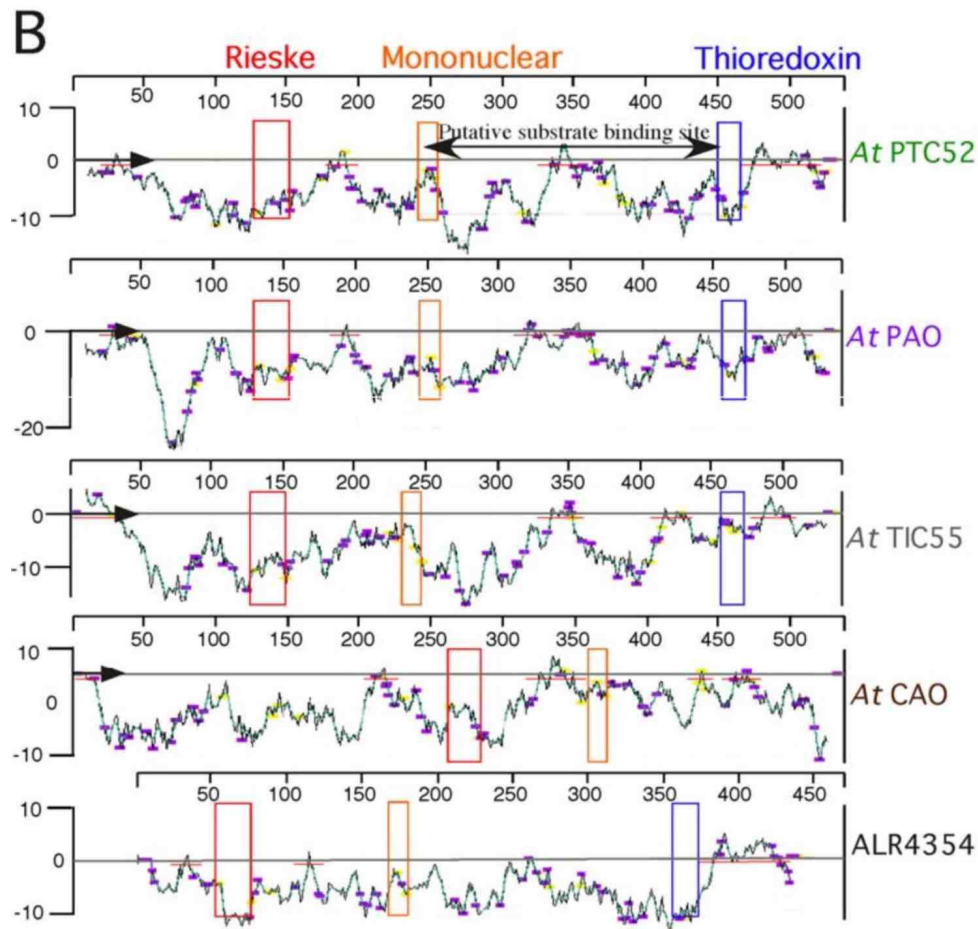


Figure 1. Evolutionary relationships among PTC52 and related land plant and cyanobacterial non heme oxygenases.

(B) Comparison of hydropathicity plots between *A. thaliana* PTC52-related non-heme oxygenases and *Nostoc* species PCC7120 ALR4354. Hydropathy plots were determined using an experimentbased Wimley-White whole-residue hydrophobicity octanolinterface scale and the Membrane Protein Explorer (MPEx) tool (<http://blanco.biomol.uci.edu/mpex/>). The hydropathy profile is shown in black with a superimposed version in green. Red bars indicate possible *trans*-membrane or membrane associated regions. Aromatic residues (F, W, and Y) are highlighted in purple and H residues in yellow.

Via this CxxC motif, TIC55, PTC52 and PAO are prone to regulation by the thioredoxin system and also respond to oxidative stress (Bartsch et al., 2008). No CxxC motif is present in CAO, which exhibits a larger NH₂-terminus not contained in PTC52, PAO or TIC55, and CAO does not respond to either the thioredoxin system or oxidative stress (Bartsch et al., 2008). Using *in planta* assays, Yamasoto et al. (2005) showed that the NH₂-terminus of CAO serves as Chlide *a* sensor and regulates the stability of the enzyme. CAO is found both in the envelope as well as thylakoids (Reinbothe et al., 2006). Envelope-bound CAO plays a role in the regulated import of the Chl *b*-containing light-harvesting proteins LHCII and CP29 into chloroplasts in that it ties Chlide *b* synthesis to protein translocation (Reinbothe et al., 2006). For PTC52 a similar, though

distinct, function in the Pchl_{ide}-dependent plastid import pathway of pPORA was proposed (Reinbothe et al., 2004a). Here we confirm the *in vivo* role of PTC52 using a combination of genetic and biochemical approaches. Our findings reveal that PTC52 plays an essential function for Chl precursor biosynthesis, protein import and early embryo development.

Results

Identification of *Atptc52* knockout plants

PTC52 of barley was isolated by its co-purification with pPORA in import intermediates trapped in junction complexes between the outer and inner plastid envelope membranes at 0.1 mM Mg-ATP and 0.1 mM Mg-GTP (Reinbothe et al., 2004a). The determined partial amino acid sequence of barley PTC52 (HvPTC52) corresponds to EST clone BF266467. This EST is predicted to contain a Rieske ($CxHx_{16-17}Cx_2H$) and mononuclear iron binding ($Nx_2Dx_{3-4}Hx_4H$) motif and the predicted amino acid sequence is most similar to the At4g25650 gene product of *A. thaliana* (AtPTC52). The structure of At4g25650 is shown in Fig. 2A. We identified *A. thaliana* mutants in the Salk Institute Genomic Analysis Laboratory collection (Alonso et al., 2003) carrying a T-DNA insertion upstream of the *AtPTC52* gene (SALK_011945) (Fig. 2A and B). PCR analysis of the T-DNA/*AtPTC52* junction established that the insertion is located 198 bp upstream of the ATG start codon and thus in a region that may regulate the expression of the *AtPTC52* gene. We refer to this mutant allele as *Atptc52-1*. DNA gel blot analysis of genomic DNA using a T-DNA specific probe, revealed a strong and a weak band from heterozygous *AtPTC52-1/Atptc52-1* plants that had been digested with *EcoRI*, and one specific T-DNA band with DNA that had been digested with *BamHI* (Fig. 2C).

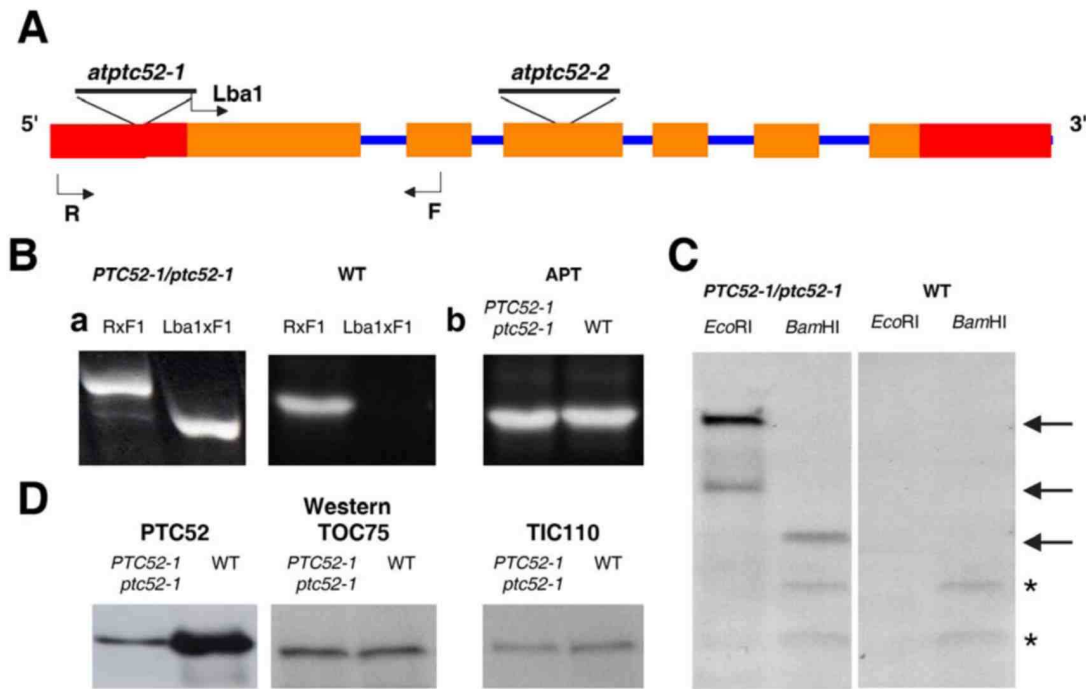


Figure 2. Identification of *Atptc52-1*.

(A) Structure of *AtPTC52* and respective mutation sites (Salk_011945 [*Atptc52-1* allele]; Garlic_148_H05.b.1a.Lb3Fa; SAIL_148.HC5 [*Atptc52-2* allele]). 5'- and 3'-untranslated regions are in red, exons and introns in ochre and blue, respectively. The 4.5 kb T-DNA insertions (not drawn to scale) are shown as black bars. Initiation sites for R, F and Lba1 primers used for PCR analyses are marked.

(B) Confirmation of the T-DNA insertion by PCR amplification. Genomic DNA from *AtPTC52/Atptc52-1* plants (*PTC52/ptc52-1*) or wild-type plants was amplified using the indicated primer combinations (panel a). As control, adenine phosphoryl transferase (APT) was amplified for mutant and wild-type plants (panel b).

(C) DNA gel blot analysis of *AtPTC52/Atptc52-1* plants. Genomic DNA (10 µg) from *AtPTC52/Atptc52-1* plants or wild-type plants was digested with either *EcoRI* or *BamHI*, and the fragments were resolved by electrophoresis and hybridized to a kanamycin resistance gene probe. Arrows indicate specific DNA fragments obtained from *AtPTC52/Atptc52-1* plants, and asterisks indicate nonspecific signal present in both mutant and wild-type DNA.

(D) Western blot of PTC52, TOC75 and TIC110 in chloroplasts of 4 weeks-old wild-type (WT) and *AtPTC52/Atptc52-1* plants.

We interpret this result as evidence for a single T-DNA insertion in the *AtPTC52* gene. PCR analyses of the *PTC52* locus in the progeny of self-crossed *Atptc52-1/AtPTC52* plants did not yield homozygous knockout plants. Furthermore, segregation of the T-DNA-linked kanamycin resistance gene produced a ratio of 66.3 % resistance to 33.7 % sensitive plants, a value very close to the expected 2:1 ratio if the knockout of *AtPTC52* was lethal and prevented the production of viable seeds. Thus, we conclude that the knockout of the *PTC52* gene is indeed lethal. This is further confirmed by visual analysis of the siliques of self-

crossed *Atptc52-1/AtPTC52* plants (Fig. 2E, panel a) which indicated that approximately one-quarter (24.5 %) of the seeds failed to develop (Fig. 2F).

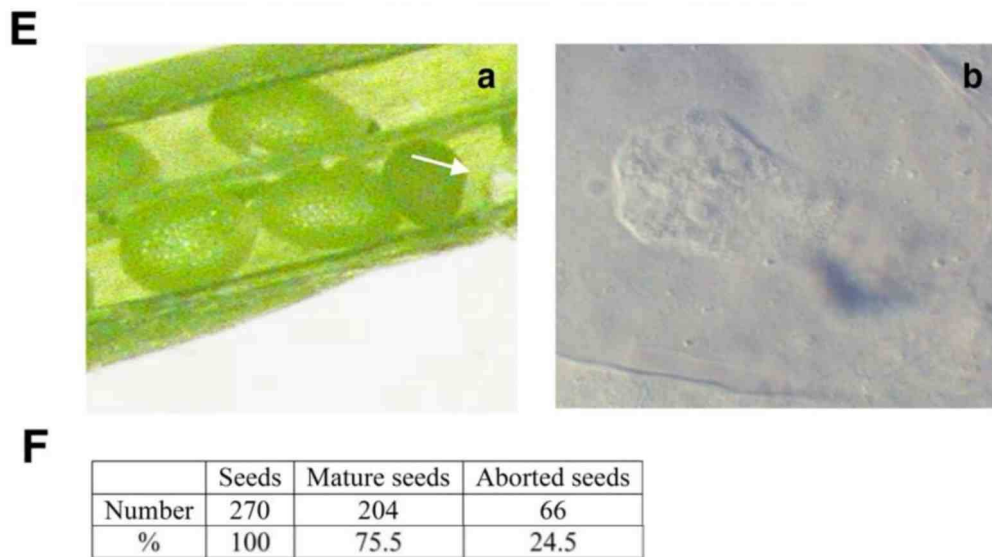


Figure 2. Identification of *Atptc52-1*.

(E) Examination of siliques of self-crossed *AtPTC52-1/Atptc52-1* plants by light microscopy (panel a). The arrow indicates the position of an aborted seed. Arrest of embryo development was revealed by Nomarski optics (panel b).

(F) Quantitative analysis of the numbers of mature and aborted seeds in the siliques of self-crossed *AtPTC52/Atptc52-1* plants.

Examination of embryos formed during seed development by microscopy confirmed that they aborted very early and before the globular stage (Fig. 2E, panel b). Subsequent to the analysis of the *Atptc52-1* mutant, we identified a second T-DNA insertion mutant allele from the Syngenta collection (Garlic_148_H05.b.1a.Lb3Fa, SAIL_148.HC5; referred to as *Atptc52-2* in Fig. 2A; Sessions et al., 2002) the segregation and phenotypic properties of which were indistinguishable from those of the SALK line described before (data not shown). Thus, *Atptc52* null mutants are lethal. All subsequent mutant analyses in this manuscript refer to the allele *Atptc52-1*.

Haploinsufficiency of PTC52 in Heterozygous *AtPTC52/Atptc52* Plants

Because of the lethality of *Atptc52* homozygotes, heterozygous *AtPTC52/Atptc52* plants were utilized to gain insights into the role of PTC52 *in planta*. *AtPTC52/Atptc52* seeds were germinated in the dark for variable periods and subsequently exposed to white light. Visual inspection of the seedlings suggested a drastic impairment of greening (Fig. 3).

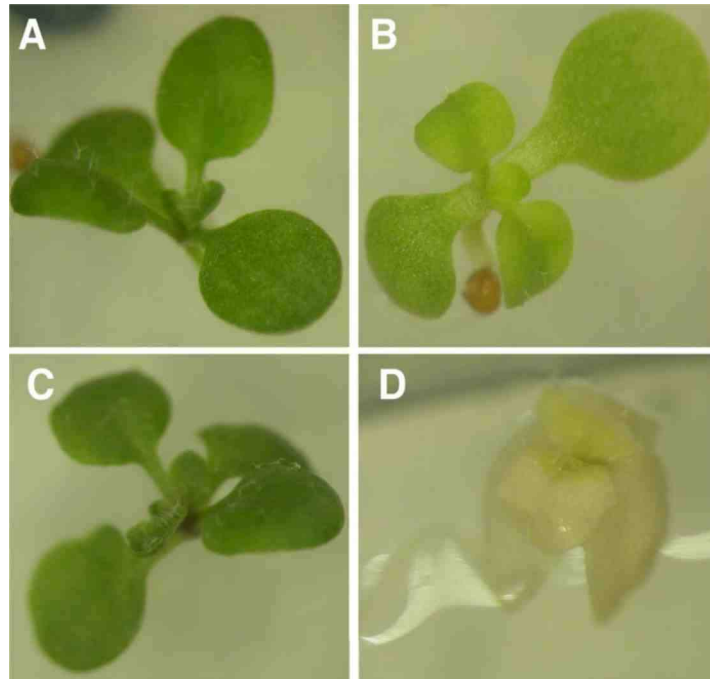


Figure 3. Phenotype of *AtPTC52/Atptc52* seedlings.

(A)-(D) Wild-type (A and C) and *AtPTC52-1/Atptc52* (B and D) seedlings were grown in the dark for 2.5 days (A and B) or 4.5 days (C and D) and subsequently illuminated at 65 mE m⁻² sec⁻¹ for 6 d (A and B) and 4 d (C and D), respectively, and photographed.

The greening defect was dependent on seedling age. Younger *AtPTC52-1/Atptc52-1* seedlings were less sensitive to illumination than older seedlings (Fig. 3, compare B and D). Chlorophyll accumulation kinetics confirmed that *AtPTC52/Atptc52* seedlings greened more slowly than wild-type plants at low light (5 $\mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) as well as high light (125 $\mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) intensities (Fig. 4A and Table 1).

Table 1. Pigment accumulation in heterozygous *AtPTC52-1/Atptc52-1* plants

Pigment (pmol per g fresh weight)		
	Wild-type	<i>AtPTC52-1/Atptc52-1</i>
Darkness (5d D)		
Pchl <i>a</i>	250±35	3050±270
Pchl <i>b</i>	1050±185	375±70
Illuminated (4d D + 24h L)		
Pchl <i>a</i>	250±40	2000±150
Pchl <i>b</i>	250±75	350±80
Chl <i>a</i>	5500±200	500±100
Chl <i>b</i>	2750±125	50±10

Seedlings were grown for 5 d in darkness and pigments were extracted with 100 % acetone containing 0.1 % diethylpyro-carbonate (DEPC) and subjected to HPLC as described previously (Reinbothe et al., 2003a, 2003b). In a parallel experiment, seedlings were germinated for 4 d in the dark and transferred to white light of 125 $\mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ for 24 h. Identification and quantification of the HPLC-resolved pigments was made by absorbance measurements using a photodiode array detector and known standards. Mean values refer to three independent experiments.

More significantly, they expressed approximately 40 % and 10 %, respectively, of the total chlorophyll content found in the wild-type after 3 days of greening (Fig. 4A). When the abundance of POR was examined by Western blotting in etioplast extracts, two bands were visible, of which the upper was barely detectable in 5 d-old etiolated *AtPTC52/Atptc52* plants as compared to wild-type plants (Fig. 4B, panel a). In 4 d-old etiolated *AtPTC52/Atptc52* plants which had been exposed to white light of 125 $\mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, both POR protein bands were below the limit of detection, while only the upper band was reduced in amount in the wild-type (Fig. 4B, panel a). Respective controls using protein extracts from isolated etioplasts of *pora*- and *porb*-deficient knockout plants conformed the identity of the bands as PORA (upper band) and PORB (lower band) (Fig. 4B, panel a).

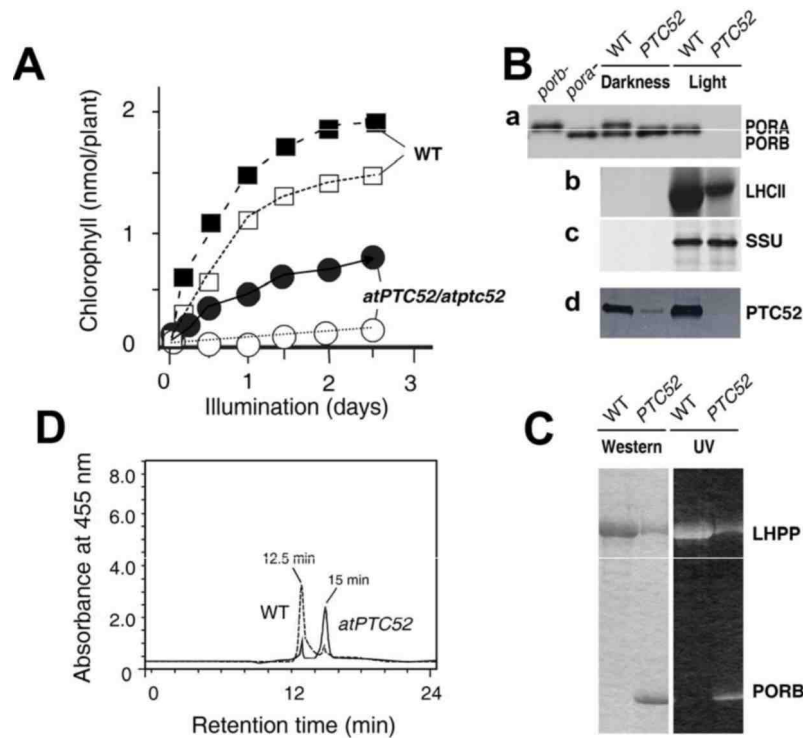


Figure 4. Characteristics of *AtPTC52/Atptc52-1* plants.

(A) Chlorophyll accumulation kinetics determined for 5 d-old, dark-grown *AtPTC52/Atptc52-1* (filled and open circles) and wild-type seedlings (filled and open squares) that had been exposed to white light of 5 mE m⁻² sec⁻¹ (filled circles and squares) or 125 mE m⁻² sec⁻¹ (open circles and squares) for the indicated periods.

(B) POR abundance in etioplasts and etiochloroplasts of 5 d-old dark-grown *AtPTC52/Atptc52-1* and wild-type seedlings (Darkness) as well as 4 d-old mutant and wild-type seedlings that had been exposed to white light of 125 mE m⁻² sec⁻¹ for 24 h (Light) (panel a). For comparison, etioplast protein extracts from *A. thaliana porb-* and *pora-* knockout plants were used. As references, parallel Western blots were probed with antisera to LHCII (panel b), SSU (panel c) or PTC52 (panel d).

(C) Detection of light-harvesting POR:Pchl (LHPP) as well as PORB-pigment complexes in etioplasts of dark-grown *AtPTC52/Atptc52-1* and wild-type seedlings by Western blotting using POR antiserum (left panel) and pigment fluorescence under UV light (right panel).

(D) HPLC of pigments present in dark-grown *AtPTC52/Atptc52-1* (solid line) and wild-type (dashed line) seedlings.

Non-denaturing electrophoresis of POR-pigment complexes demonstrated lower amounts of light-harvesting POR-Pchl (LHPP) complexes in the prolamellar bodies of etioplasts from *AtPTC52/Atptc52* as compared with wild-type plants (Fig. 4C). These LHPP complexes are presumed to confer photoprotection onto greening seedlings (Reinbothe et al., 1999; 2003b). Pigment analyses by HPLC identified both Pchl *a* and Pchl *b* in wild-type seedlings and unveiled a change in their relative proportion towards Pchl *a* in *AtPTC52/Atptc52* seedlings (Fig. 4D). These changes correlated with an altered Chl *b*-to-Chl *a* ratio and a

reduction of LHCII levels during the early hours of greening (Table 1 and Fig. 4B, panel b). Together, the results suggested decreases in normal Chl accumulation that were caused by the haploinsufficiency of PTC52 protein in the heterozygous plants. *In vitro*-import experiments demonstrated a ca. 90 % reduction in uptake of ^{35}S -pPORA but not of ^{35}S -pPORB (Fig. 4E). As controls, ^{35}S -pSSU of soybean and ^{35}S -pre FD (pFD) of *Silene pratensis* were used that did not reveal gross differences in import for *AtPTC52/Atptc52* and wild-type chloroplasts (Fig. 4E and data not shown).

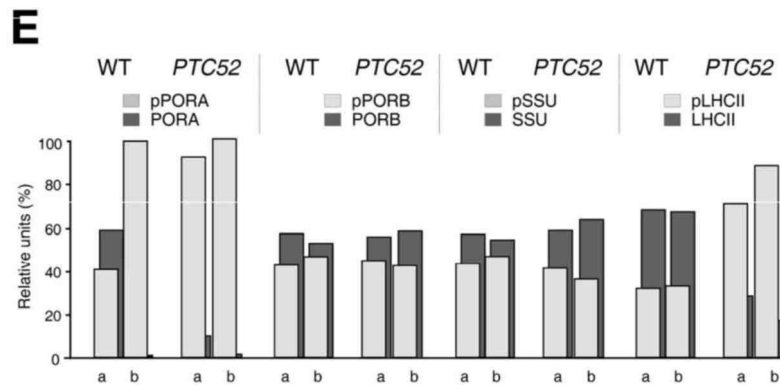


Figure 4. Characteristics of *AtPTC52/Atptc52-1* plants.

(E) *In vitro*-import of ^{35}S -pPORA, ^{35}S -pPORB, ^{35}S -pSSU and ^{35}S -pLHCII into chloroplasts isolated from 4 weeks-old light-grown *AtPTC52/Atptc52-1* and wild-type seedlings. To study the substrate-dependent import of pPORA, an aliquot of the chloroplast suspension was pretreated with a 0.5 mM aqueous solution of 5-aminolevulinic acid to give rise to intraplastidic Pchlide synthesis (lane a in each set). Mock incubations contained phosphate buffer (lane b in each set). Following import, the plastids were sedimented and aliquots were treated with or without thermolysin (Thl) to allow precursor and mature protein levels to be distinguished by SDS-PAGE and autoradiography or liquid scintillation counting. Light grey and dark-grey columns define precursor and mature protein levels, respectively. Percentages refer to the sum of precursor and mature protein levels in the assays, set as 100.

By contrast, a ca. 40-50 % inhibition of import was observed for ^{35}S -pLHCII in *AtPTC52/Atptc52* versus wild-type chloroplasts. This result is at first glance unexpected but may be understood when recalling that pLHCII import requires Chlide *b* (Reinbothe et al., 2006). The enzyme responsible for producing Chlide *b* is CAO (Oster et al., 2000). A fraction of CAO is localized in the inner plastid envelope where it operates in Chlide *a* oxygenation to produce Chlide *b* (Reinbothe et al., 2006). Chlide *a* is formed from Pchlide *a* by virtue of the action of PORB that has a dual localization in the envelope membranes and internal plastid membranes (prolamellar bodies in etioplasts; thylakoids in chloroplasts) (Reinbothe et al., 1995; Ferro et al., 2001,2002; Peltier et al., 2004). Thus, an indirect link exists between

pLHCII import and PORB activity. *In vivo*, slight reductions in the level of *LHCB1* transcripts encoding LHCII were observed in *AtPTC52/Atptc52* seedlings during greening (Supp. Fig. 11A). *AtPTC52* transcript accumulation was drastically depressed in leaf tissues of 6-weeks-old *AtPTC52/Atptc52* as compared with wild-type plants (Supp. Fig. 11B). In either case, no *AtPTC52* transcripts were detectable in roots (Supp. Fig. 11B). Illumination experiments demonstrated a light-induced increase in *AtPTC52* transcript levels in 5 d-old dark-grown *AtPTC52/Atptc52* and wild-type seedlings (Supp. Fig. 11C). These results may suggest additional roles of *AtPTC52* in light-adapted plants.

Reconstituted *AtPTC52* Catalyzes Pchl *b* Production

A full-length cDNA was isolated corresponding to At4g25650. The predicted amino acid sequence is shown in Supp. Fig. 12. The protein consists of 536 amino acids and has a predicted M_r of 61.3 kDa. Its calculated pI of 8.9 is reminiscent of that for proteins of the inner plastid envelope membrane (Ferro et al., 2002, 2003). The protein is predicted to contain several *trans*-membrane segments and an amino terminal transit peptide for plastid import, beginning at position 55 (Supp. Fig. 12). When *AtPTC52* cDNAs encoding the predicted transit peptide-containing and transit peptide-less proteins were expressed with carboxy-terminal hexahistidine (His)₆ tags and purified by Ni-NTA chromatography from wheat germ lysates, ≈ 57 kDa and ≈ 52 kDa proteins (henceforth referred to as AtpPTC52 and AtPTC52, respectively) were detectable by SDS-PAGE (Fig. 5A, lanes a and b). With wheat germ lysate programmed with the naked vector DNA lacking the *At(p)Ptc52* cDNA inserts, no protein products of the expected size were obtained (Fig. 5A, lane c).

Activity measurements were carried out for AtPTC52 as well as AtpPTC52. Wheat germ-translated and purified AtpPTC52 and AtPTC52 were incubated with Pchl *a* in the presence of O₂, ferredoxin (FD), and a FD-reducing system comprising glucose-6-phosphate, NADPH, glucose-6-phosphate dehydrogenase and FD:NADPH oxidoreductase (FNR). Figure 5B shows representative HPLC tracings of pigments formed in the absence (solid line) or presence of the AtpPTC52 and AtPTC52 proteins (dotted and dashed lines, respectively) and the different supplements.

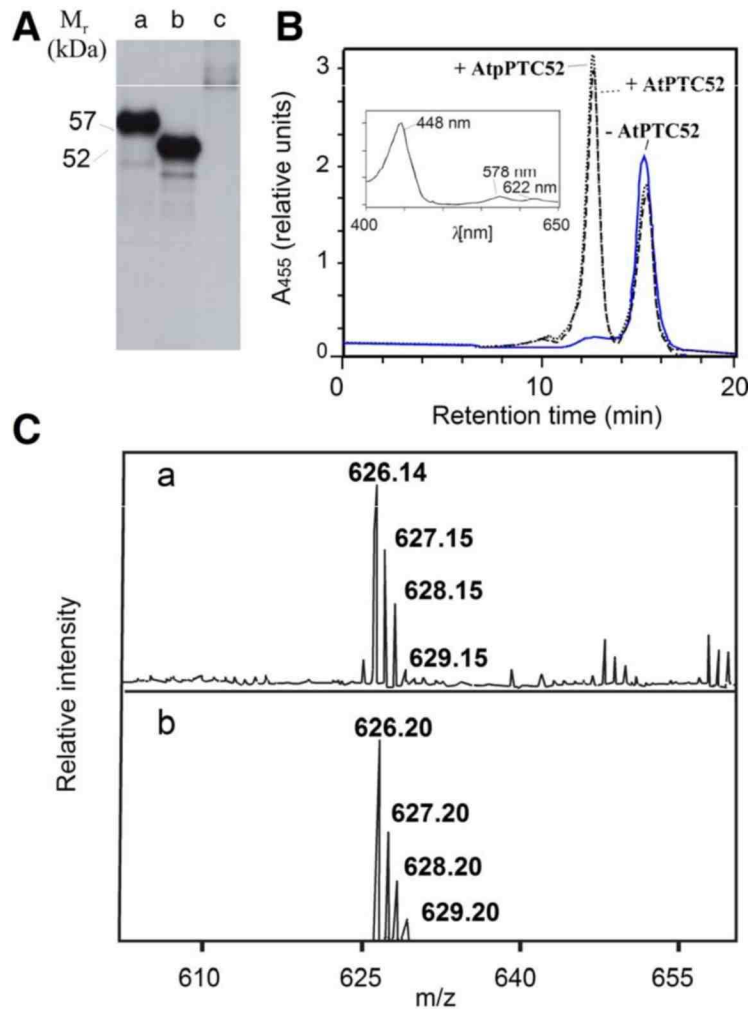


Figure 5. AtPTC52 exhibits Pchlide *a* oxygenase activity.

(A) SDS-PAGE and autoradiography of ³⁵S-AtPTC52 (lane 1) and ³⁵S-AtpPTC52 (lane 2) translated in a wheat germ lysate. Lane 3 shows the naked vector DNA control not giving rise to the expected products.

(B) Pchlide *a* oxygenase activity of AtpPTC52 (dotted line) AtPTC52 (dashed line) and of the respective control without At(p)PTC52 (solid line). The curves show HPLC tracings of acetone-extracted pigments at 455 nm, monitored by a photodiode array detector, and the inset depicts an absorption spectrum of the peak eluting at 12.5 min.

(C) Confirmation of the identity of Pchlide *b* eluting at 12.5 min by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (a) and theoretical isotopic distribution of C₃₅H₃₀N₄O₆Mg corresponding to Pchlide *b* (b). The matrix used was terthiophene (molecular weight 248.4).

Pchlide *a* has a retention time of 15 min on the C18 HPLC column. The second peak, which was formed only in the presence of the AtpPTC52 and AtPTC52 proteins, eluted at 12.5 min. Absorbance measurements of this second peak using a photodiode array detector identified a major absorption maximum at 448 nm and two lower maxima at 578 nm and 622 nm, respectively (Fig. 5B, inset). These wavelengths corresponded to values reported previously for Pchlide *b*: the so-called Soret band (448 nm), the Q_x band (578 nm) and the Q_y band

(622 nm) (Scheumann et al., 1999; Oster et al., 2000; Reinbothe et al., 2003a). The Q_x band had a higher absorbance than the Q_y band, which is a typical feature of all investigated pigments of the proto *b* series (Scheumann et al., 1999; Oster et al., 2000; Reinbothe et al., 2003a). That the resolved pigment indeed represented Pchl *b* was proven by matrix-assisted laser desorption/ionization spectroscopy. As shown in Fig. 5C, the major peak was at *m/z* 626.1 and had the same isotopic distribution as expected from the chemical formula of Pchl *b*. When the HPLC tracings were compared, the measured low decrease in Pchl *a* levels after incubation with the AtpPTC52 and AtPTC52 proteins correlated with an apparently large, 5-fold increase in the amount of Pchl *b* (Fig. 5B, dotted and dashed lines), reflecting the 5-fold difference in the absorption coefficients of Pchl *a* and Pchl *b* at the chosen wavelength of 455 nm (Scheumann et al., 1999; Reinbothe et al., 2003a). Pchl *a* to Pchl *b* conversion required O₂ and a FD-reducing system. In the absence of these factors, no Pchl *b* was produced (data not shown). With wheat germ lysate which had been programmed with the naked vector DNA and thus lacked the AtpPTC52 and AtPTC52 proteins, no Pchl *b* was detectable (Fig. 5B, solid line). This result indicated that Pchl *b* formation is an enzymatic reaction requiring the At4g25650 gene product.

Import of AtpPTC52 into Isolated Chloroplasts is Mg-GTP and Mg-ATP dependent

Wheat germ-translated ³⁵S-AtpPtc52 was incubated with isolated, energy-depleted barley and *A. thaliana* chloroplasts either in the absence of added nucleoside triphosphates (used to study energy-independent binding) or in the presence of 0.1 mM Mg-ATP (used to study energy-dependent binding), 0.1 mM Mg-ATP plus 0.1 mM Mg-GTP (used to study the insertion of the precursor into the respective import apparatus) or 2 mM Mg-ATP plus 0.1 mM Mg-GTP (used to study import) (Kouranov and Schnell, 1997). Upon incubating ³⁵S-AtpPTC52 with isolated, energy-depleted barley chloroplasts in the absence of added Mg-ATP and Mg-GTP, a faint amount of protein could be recovered in a plastid-bound state after re-sedimentation of the chloroplasts (data not shown).

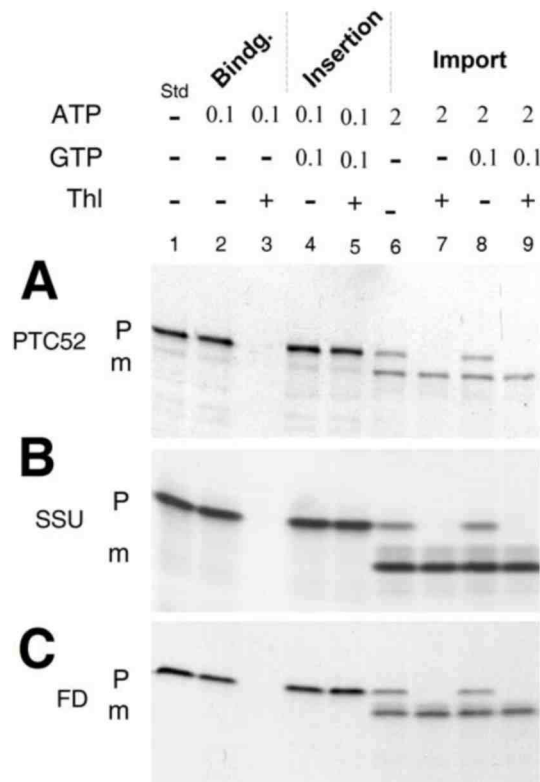


Figure 6. *In vitro*-import and processing of AtpPTC52 with isolated barley chloroplasts.

(A) Plastid binding, insertion, and import of ^{35}S -AtpPTC52. After incubation in the presence of the indicated concentrations of Mg-GTP and Mg-ATP (in mM), the plastids were re-sedimented, treated with or without thermolysin (Thl), and the amount of precursor and mature proteins bound to the plastids were determined by SDS-PAGE and autoradiography.

(B) as in (A), but showing plastid binding, insertion, and import of the small subunit precursor of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (pSSU).

(C) as in (A), but depicting the binding, insertion, and import for the precursor of ferredoxin (pFD). P and m mark precursors and mature proteins, respectively; Std defines ^{35}S -input standards.

In the presence of 0.1 mM Mg-ATP, binding of ^{35}S -AtpPTC52 to chloroplasts was stimulated allowing ca. 70-80 % of precursor to be recovered in a plastid-bound form obtained after re-centrifugation of the import assays (Fig. 6A). Sensitivity towards thermolysin revealed that ^{35}S -AtpPTC52 was bound to, but had not inserted into, the respective import machinery of the outer membrane of the chloroplast (Fig. 6A, compare lanes 2 and 3). This insertion of the precursor required addition of 0.1 mM Mg-GTP and 0.1 mM Mg-ATP. ^{35}S -AtpPTC52 then attained a largely thermolysin-resistant form (Fig. 6A, lanes 4 and 5).

This result, which is at variance with other reports in the chloroplast protein import field, may reflect the use of sucrose instead of sorbitol during plastid isolation and manipulation. Sucrose is known to confer a greater stability to membrane assemblies than sorbitol both *in vitro* and *in vivo* (Crowe and Crowe, 1984; Crowe et al., 1984). On the other hand, TOC159 is easily

converted into smaller fragments lacking most of the receptor binding domain if no precautions are taken (Bölter et al., 1998; Chen et al., 2000). No such cleavage was observed under the tightly controlled conditions in our experiments (data not shown) and thus may explain the high binding efficiency. Upon raising the Mg-ATP concentration to 2 mM, a fraction of ^{35}S -AtpPTC52 was imported and processed into a smaller, ≈ 52 -kDa product (Fig. 6A, lanes 8 and 9). In line with recent studies (Inoue and Akita, 2008), import and processing did not require Mg-GTP and was detectable also in the absence of this compound (Fig. 6A, lanes 6 and 7). Similar results were obtained for ^{35}S -SSU and ^{35}S -FD used as controls (Fig. 6B and C).

AtPTC52 is localized to a protein complex in the inner chloroplast membrane

We next assessed the localization of PTC52 within plastids. ^{35}S -AtpPTC52 was imported into isolated, energy-depleted barley and *A. thaliana* chloroplasts in the presence of 0.1 mM Mg-GTP and 2 mM Mg-ATP. Then the plastids were re-isolated, treated with thermolysin, and re-purified. After lysis under hypertonic conditions, plastids were fractionated into envelopes, thylakoids and stroma (Li et al., 1991), and mixed envelopes were fractionated further into outer and inner envelope membranes (Schnell et al., 1994). Protein in each of the different fractions was separated by SDS-PAGE, blotted onto nitrocellulose filters and processed by Western blotting, using antisera against TIC110 and TOC75. ^{35}S -AtPTC52 was detected by autoradiography.

Figure 7A and B demonstrates that the imported ^{35}S -AtPTC52 co-fractionated with TIC110 in the inner plastid envelope membrane fraction of barley and *A. thaliana* chloroplasts. No signal was obtained with stromal and thylakoid fractions as well as isolated outer plastid envelope membranes containing TOC75 (Fig. 7A and B).

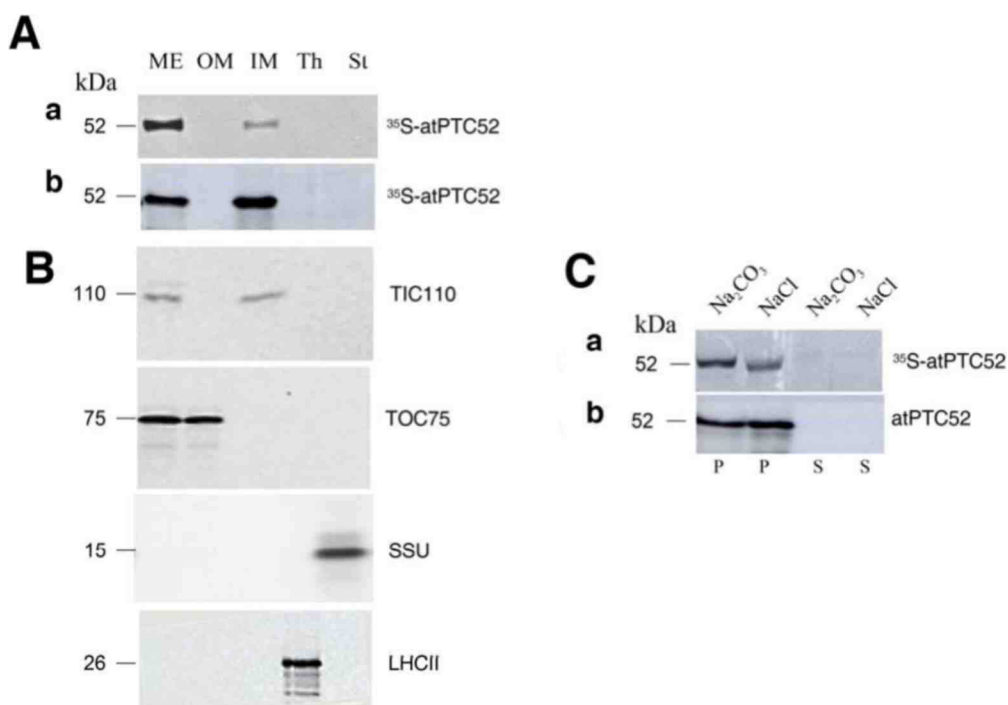


Figure 7. Localization of imported ^{35}S -AtPTC52 in the inner plastid envelope membrane of chloroplasts.

(A) Detection of ^{35}S -AtPTC52 imported into the inner envelope of barley (a) and *A. thaliana* (b) chloroplasts.

(B) Western blot to detect TIC110, TOC75, the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (SSU) and the light-harvesting protein LHCII in mixed envelopes (ME), outer (OM) and inner (IM) envelope membranes, as well as the stroma (St) and thylakoids (Th).

(C) Salt extractability of ^{35}S -AtPTC52 imported into the inner envelope of barley (a) and *A. thaliana* (b) chloroplasts. After extraction with either 0.1 M Na_2CO_3 or 1 M NaCl , inner envelope membranes were sedimented by centrifugation and the amount of ^{35}S -AtPTC52 present in the membrane pellets (P) and supernatant fractions (S), respectively, was determined by SDS-PAGE and autoradiography.

When inner envelope membranes containing imported ^{35}S -AtPTC52 were re-isolated, purified and subsequently extracted with either 0.1 M Na_2CO_3 , pH 11, or 1 M NaCl , radioactive protein was found in the membrane pellets but not in the respective supernatant fractions obtained after centrifugation, both in assays containing barley or *A. thaliana* chloroplasts (Fig. 7C). Consistent with the structure predictions made in Supp. Fig. 12 and previous results (Reinbothe et al., 2004a, 2006; Bartsch et al., 2008) we concluded that PTC52 is an intrinsic membrane protein of the inner plastid envelope of chloroplasts. Hydropathy plot analysis using Membrane Protein Explorer (MPEx) suggests up to four possible *trans*-membrane domains (See Fig. 1b).

PTC52 interacts with pPORA and other PTC proteins

To examine the interaction of PTC52 with other PTC proteins, bacterially expressed AtpPTC52-(His)₆ was imported into isolated barley chloroplasts. Then, mixed outer and inner envelope membranes were isolated from ruptured chloroplasts and solubilized with 1.3 % decyl maltoside. Protein complexes containing AtpPTC52-(His)₆ were purified by Ni-NTA chromatography and bound protein was dissociated and analyzed by non-denaturing, analytical PAGE and Western blotting (Reinbothe et al., 1990). Pilot experiments revealed that AtPTC52-(His)₆ was able to establish larger complexes after import (Supp. Fig. 13). Both endogenous PTC52-containing as well as newly formed AtPTC52-(His)₆-containing complexes were detectable (Supp. Fig. 13). Their relative proportion was a function of the concentration of imported AtPTC52-(His)₆. When the AtPTC52-(His)₆-containing complex was established with 2.5 nmoles of AtpPTC52-(His)₆ (see Supp. Fig. 13, lane 2), one main band and a second, weaker band were obtained (Fig. 7D, panel b, *Ptc52*-(His)₆, band I *versus* band II). Both bands contained PTC52 and therefore could be precipitated with anti-PTC52 serum (Fig. 7D, panel c, *IP*).

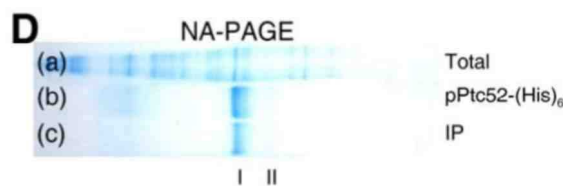


Figure 7. Localization of imported ³⁵S-AtPTC52 in the inner plastid envelope membrane of chloroplasts.

(D) Detection of PTC52-containing envelope complexes formed at 2.5 nmoles of AtpPTC52-(His)₆ in barley chloroplasts. The nondenaturing gel shows total envelope proteins and complexes prior to (panel a: *Total*) and after (panel b: *PTC52*-(His)₆) an *in vitro*-import reaction with AtpPTC52-(His)₆ as well as respective immunoprecipitates (panel c: *IP*) obtained with PTC52 antiserum. Band I and band II designate PTC52-containing bands.

After a brief pH shift to remove the bulk of bound IgG, the two PTC52-containing bands were subjected to 2D-SDS-PAGE. While band I provided a complex pattern of spots comprising PTC47, PTC33, PTC/OEP16 and three other spots of approximately 27 kDa, 22 kDa and 20 kDa (Fig. 7E), band II gave rise to only a single spot (not shown).

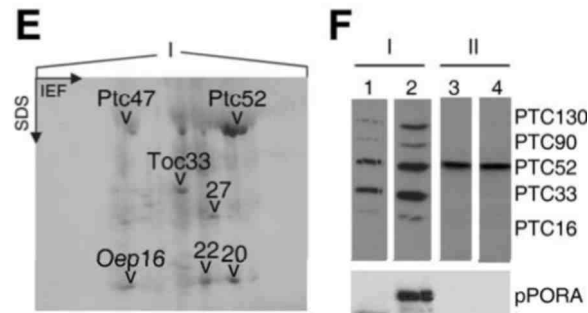


Figure 7. Localization of imported ^{35}S -AtPTC52 in the inner plastid envelope membrane of chloroplasts.

(E) 2D-SDS-PAGE of proteins bound to AtpPTC52-(His)₆ in barley chloroplasts. Immunoprecipitated complexes corresponding to band I in (A) were dissociated and subjected to a combined isoelectric focusing (IEF)/SDS-PAGE separation. The indicated spots contained PTC47, PTC33/TOC33 and PTC16/OEP16, as determined by mass spectrometry. The spot marked PTC52 is due to AtPTC52-(His)₆ used as bait to isolate the complex. Arrowheads indicate three unidentified spots that co-purified with AtPTC52-(His)₆ during complex isolation.

(F) Detection of PTC proteins bound to AtpPTC52-(His)₆ in barley chloroplasts and etiochloroplasts. AtpPTC52-(His)₆-containing bands I and II were established with chloroplasts (lanes 1 and 3) and etiochloroplasts (lane 2 and 4), respectively. Protein bound to AtpPTC52-(His)₆ then was purified by Ni-NTA chromatography, eluted and subjected to 1D-SDS-PAGE. Proteins were detected by Western blotting using a mixed antiserum against the indicated PTC proteins (upper panel) or POR antiserum (lower panel).

Except for PTC33 and AtPTC52-(His)₆, the amounts of the other co-purifying proteins (spots) were sub-stoichiometric and ca. 2- to 4-fold excesses of AtPTC52-(His)₆ were seen (Fig. 7E and F, lane 1). This result suggested that AtPTC52-(His)₆ had not strongly interacted with most of the PTC proteins in the absence of the pPORA import substrate. As shown previously, PTC complex formation is strongly favoured in the presence of pPORA (Reinbothe et al., 2004a, 2005). In agreement with this view, the amounts of PTC130, PTC33, PTC16 and PTC proteins were increased when AtPTC52-(His)₆ was imported into etiochloroplasts of dark-grown plants which had been exposed to light for 2 h prior to plastid isolation (Fig. 7F, upper panel, compare lane 2 *versus* lane 1). Consistent with previous results (Reinbothe et al., 1996a, 2000, 2006), a fraction of the cytosolic pPORA then accumulated in the envelope membranes (Fig. 7F, lower panel) and established strong interactions with PTC52 and the other PTC proteins that allowed for their purification (Fig. 7F, upper panel). Band II most likely represents the endogenous barley PTC52 protein that was released from pre-existing PTC complexes by the excess of added AtPTC52-(His)₆ and did not interact with other proteins in chloroplasts and etiochloroplasts (Fig. 7F, lanes 3 and 4). In accord with this view were further results obtained by size exclusion chromatography

that revealed an apparent molecular mass of PTC complexes corresponding to band I of ≈ 650 kDa and of ≈ 50 kDa for band II (Supp. Fig. 14).

In order to confirm the interaction of AtPTC52 with pPORA, chemical crosslinking was carried out with dithiobis(succinidyl propionate) (DSP) (Lübeck et al., 1996). ^{35}S -pPORA-(His)₆ was imported into isolated, energy-depleted barley chloroplasts in the presence of 0.1 mM Mg-ATP and 0.1 mM Mg-GTP. We assumed that DSP not only would covalently connect the radiolabeled ^{35}S -pPORA to nearby proteins, but would also connect adjacent proteins to each other, giving rise to larger complexes. DSP-treated chloroplasts in turn were solubilized with lithium dodecylsulfate (LDS) and protein resolved by LDS-PAGE (Lübeck et al., 1996). An aliquot of the crosslink products was subjected to co-immunoprecipitation, using PTC52 and OEP16 antisera (Reinbothe et al., 2004a). Figure 8A shows that ^{35}S -pPORA gave rise to a larger, ≈ 600 kDa complex. This complex contained PTC52, as demonstrated by its co-precipitation with respective antiserum. In incubation mixtures lacking DSP, a ≈ 60 kDa product was produced. This band contained pPORA and PTC/OEP16, held together by strong interactions that could only be dissociated in the presence of 5% SDS and β -mercaptoethanol (Fig. 8B, lanes 4 and 5 versus lanes 2 and 3).

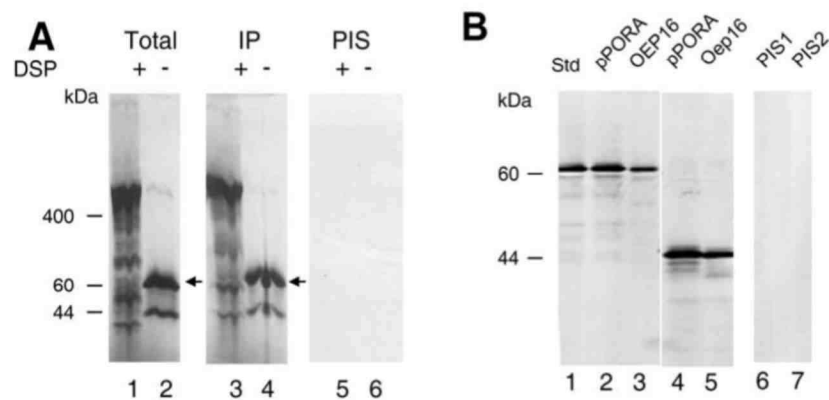


Figure 8. Interaction of PTC52 with ^{35}S -pPORA.

(A) DSP-crosslinking of imported ^{35}S -pPORA to PTC52 in barley chloroplasts. Junction complexes containing ^{35}S -pPORA-(His)₆ were prepared as described, solubilized, and the released protein run either directly by LDS-PAGE (lanes 1 and 2) or subjected to prior immunoprecipitations (IP) using anti-PTC52 (lanes 3 and 4) and pre-immune sera (PIS) (lanes 5 and 6).

(B) Identification of the ≈ 60 -kDa band generated in the absence of DSP as crosslink product of pPORA with OEP16/PTC16. Plastid envelope membranes containing imported ^{35}S -pPORA were solubilized with LDS and subjected to co-immunoprecipitation using pPORA (lanes 2 and 4) and PTC16/OEP16 (lane 3 and 5) antisera, as well as respective pre-immune sera (PIS) (lanes 6 and 7).

^{35}S -proteins were detected by LDS-PAGE and autoradiography. For samples 4 and 5, SDS was added to a final concentration of 5 % in order to dissociate the complex prior to electrophoresis. Lane 1 shows a respective input standard (Std) prior to immunoprecipitation.

PTC/OEP16 forms the translocation pore through which pPORA is transported across the outer envelope membrane during its Pchl_{ide}-dependent import (Reinbothe et al., 2004b; Pollmann et al., 2007; Schemenewitz et al., 2007).

To prove the interaction of ³⁵S-pPORA with PTC52, isolated mixed outer and inner plastid envelope membranes containing imported ³⁵S-pPORA due to a prior insertion reaction in the presence of 0.1 mM Mg-ATP and 0.1 mM Mg-GTP were extracted with 1.3 % decyl maltoside (Lübeck et al., 1996). In turn, co-immunoprecipitations were carried out with PTC52 antiserum.

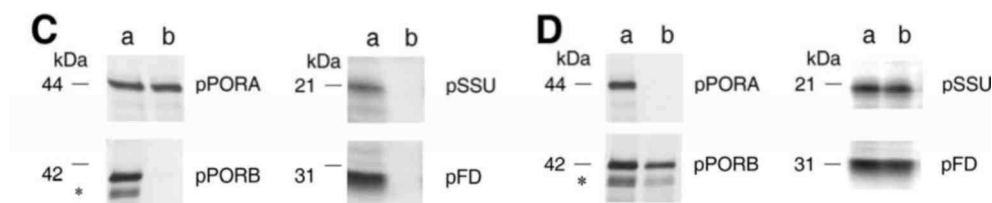


Figure 8. Interaction of PTC52 with ³⁵S-pPORA.

(C) Immunoprecipitation by PTC52 antiserum of barley ³⁵S-pPORA, but not of barley ³⁵S-pPORB, soybean ³⁵S-pSSU and *Silene pratensis* ³⁵S-pFD, from mixed outer and inner plastid envelope membranes of barley chloroplasts after their solubilization with 1.3 % decyl maltoside. Lanes a and b show the amounts of protein before and after the respective immunoprecipitations, respectively.

(D) as in (C), but showing respective immunoprecipitates obtained with TOC75 antiserum.

Results shown in Fig. 8C indicated that only ³⁵S-pPORA, but none of the other radiolabeled precursors, was co-immunoprecipitated with PTC52 antiserum. Control co-immunoprecipitation demonstrated binding of ³⁵S-pPORB, ³⁵S-pSSU and ³⁵S-pFD to TOC75 (Fig. 8D).

Inhibition of pPORA Import and PTC52 Activity by Diethylpyrocarbonate

Import reactions were conducted with ³⁵S-pPORA (a PTC52 import substrate; Reinbothe et al., 2004a, 2005), as well as ³⁵S-pSSU, ³⁵S-pPORB and ³⁵S-pFD (presumed TIC55 import substrates; Caliebe et al., 1997; Reinbothe et al., 2006) and barley and *A. thaliana* chloroplasts containing Pchl_{ide} produced by 5-aminolevulinic acid pre-treatment (Reinbothe et al., 1995). In four replicate samples, dose-response relationships were determined for 1, 5, 50 or 1000 μ M concentrations of diethylpyrocarbonate (DEPC), an inhibitor of Rieske proteins possessing conserved His residues (Ohnishi et al., 1994) comprising PTC52 and TIC55

(see Fig. 1).

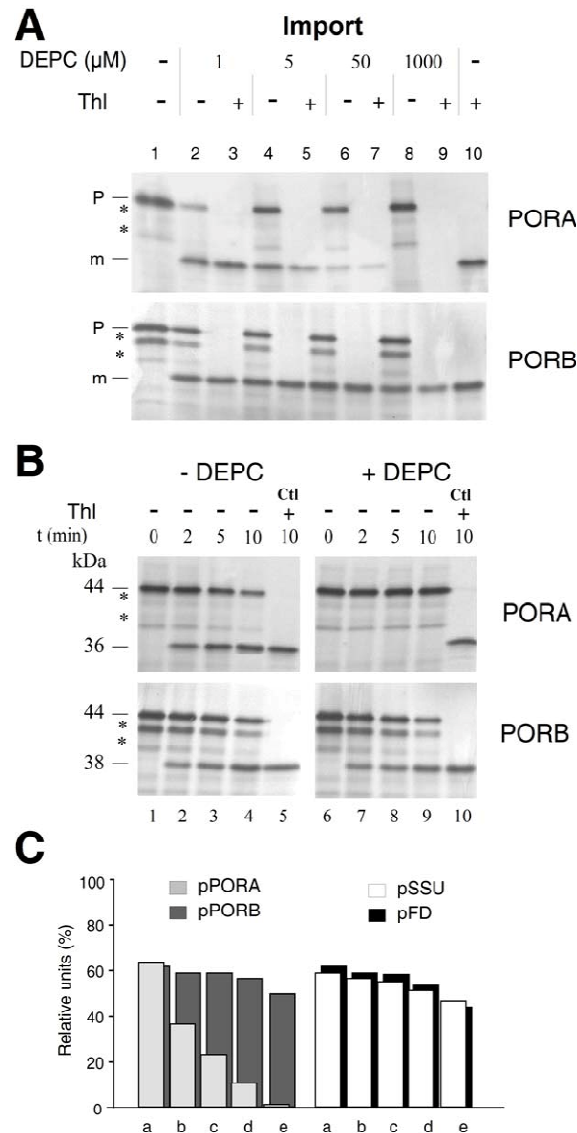


Figure 9. Inhibition of pPORA import by diethylpyrocarbonate (DEPC).

(A) Inhibition of import of barley 35 S-pPORA and 35 S-pPORB into isolated barley chloroplasts tested at 1, 5, 50 or 1000 μ M DEPC. P and m indicate precursor and mature proteins, respectively; asterisks mark degradation products.

(B) Time courses (in min) of 35 S-pPORA and 35 S-pPORB import into isolated barley chloroplasts tested in the presence (+) or absence (-) of 1 mM DEPC. Details are as in (A). Controls marked "Ctl" in lanes 5 and 10 show protein extracted from plastids treated with thermolysin (Thl) after import.

(C) as in (A), but showing protein levels for the mature 35 S-PORA (light grey columns), 35 S-PORB (dark grey columns), 35 S-SSU (white columns) and 35 S-FD (black columns) after their import into isolated barley plastids in the presence of 0 (lane a), 1 μ M (lane b), 5 μ M (lane c), 50 μ M (lane d) and 1 mM DEPC (lane e). Percentages refer to the sum of precursor and mature protein levels in the assays, set as 100.

Figure 9A shows that only import of 35 S-pPORA, but not that of the other tested precursors,

was inhibited at low, 1, 5 and 50 μM DEPC concentrations. In the presence of 1 mM DEPC, no ^{35}S -pPORA import occurred, and import of ^{35}S -pSSU, ^{35}S -pPORB and ^{35}S -pFD was reduced by 12, 14, and 8%, respectively, of control levels measured in mock-incubated assays lacking DEPC (Fig. 9B and C). These comparably low inhibitions excluded the possibility that TIC55 was a prime target of DEPC. Differences in the chosen plant species (pea *versus* barley), experimental conditions used to isolate the plastids and study import (Lübeck et al., 1996; Reinbothe et al., 1995), and topologies of TIC55 and PTC52 may account for this result.

To verify the roles of PTC52 as DEPC target, activity measurements were carried out using the *in vitro*-expressed, soluble as well as PTC-bound AtPTC52 and HvPTC52 proteins. Table 2A shows that the wheat germ-translated, soluble AtPTC52 and HvPTC52 were likewise sensitive to DEPC *in vitro*. In either case, the inhibitor dropped the activity to almost undetectable levels. Similar results were obtained for PTC complexes containing AtPTC52 and HvPTC52 (Table 2B). This result proved the involvement of His residues in the catalytic mechanism of PTC52 as Pchlide *a* oxygenase and part of the PTC complex. Most likely DEPC operated by ethoxyformylating the conserved His residues in PTC52's Rieske iron-sulfur cluster (Ohnishi et al., 1994).

Table 2 Pchlide *a*-oxygenase activity of *in vitro*-expressed or PTC-bound PTC52 in barley and *A. thaliana* chloroplasts

Protochlorophyllide <i>a</i> -Oxygenase Activity				
(nkat · mg ⁻¹ PTC52 protein)				
A	Barley		<i>Arabidopsis</i>	

	- DEPC	+ DEPC	- DEPC	+ DEPC
+ Supplements	3.8±0.20	0.10±0.01	4.0±0.2	0.14±0.02
- Supplements	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
B	Barley		<i>Arabidopsis</i>	

	- DEPC	+ DEPC	- DEPC	+ DEPC
+ Supplements	4.2±0.15	0.14±0.01	4.8±0.25	0.16±0.02
- Supplements	0.42±0.35	n.d.	0.48±0.05	n.d.

Wheat germ-translated PTC52 (A) or PTC complex-bound PTC52 (B) from barley or *A. thaliana* was used for the activity measurements. The assays contained glucose-6-phosphate, NADPH, glucose-6-phosphate dehydrogenase and differed by the presence (+ supplements) or absence (- supplements) of FD and FD:NADPH oxidoreductase (FNR). Pchlide *a* to Pchlide *b* conversion was analyzed by HPLC as described in Fig. 5. Mean values refer to three independent experiments each.

The data summarized in Table 2B additionally revealed that conversion of Pchl a to Pchl b by the isolated PTC complexes required the same FD and the FD-reducing system as the *in vitro*-reaction carried out by the soluble AtPTC52 and HvPTC52 proteins. However, low Pchl a oxygenation was also detectable in the absence of these additives (Table 2B), suggesting that some of the PTC proteins may correspond to FD and FNR. Unlike Pchl a , Chl a and Pheophorbide a were not accepted as substrates in all of our tests, proving the previously determined stringent substrate specificity of HvPTC52 for Pchl a (Bartsch et al., 2008).

Identification of Amino Acid Residues Unique to PTC52 Proteins

The recent availability of the complete genomes of several land plants permitted us to identify the complete coding regions of PTC52-related proteins and perform multiple sequence alignments (MSA) in order to identify amino residues that distinguish PTC52 from PAO, TIC55 and CAO and may illuminate the issue of substrate specificity. The full length proteins of PTC52, PAO, TIC55 and CAO proteins from two dicots (*A. thaliana* and *Populus trichocarpa*), two monocots (*Oryza sativa* and *Zea mays*) and the moss *Physcomitrella patens* were identified and aligned using CLUSTAL W (Supp. Fig. 15). In addition, CAO from *Chlamydomonas reinhardtii* and four related oxygenases from photosynthetic bacteria were included. Close inspection of this MSA revealed motifs within variable regions of these proteins that are likely to confer substrate specificity to the different family members (Supp. Fig. 15 and Supp. Table 1). The substrate binding region is suggested from crystallographic studies of a related bacterial dioxygenase – naphthalene dioxygenase (NDO) from *Pseudomonas putida* (Kauppi et al., 1998; Karlsson et al., 2003). The 17 residues that coordinate naphthalene are found in the protein region following the conserved mononuclear iron binding site, as summarized in Fig. 10A. These residues form a hydrophobic pocket conducive to the binding of the aromatic substrate. In the PTC52 clade, 18 residues (of which 7 are aromatic) were identified that are uniquely conserved in this domain and either absent or less conserved within PAO, TIC55 and CAO families (Fig. 10B).

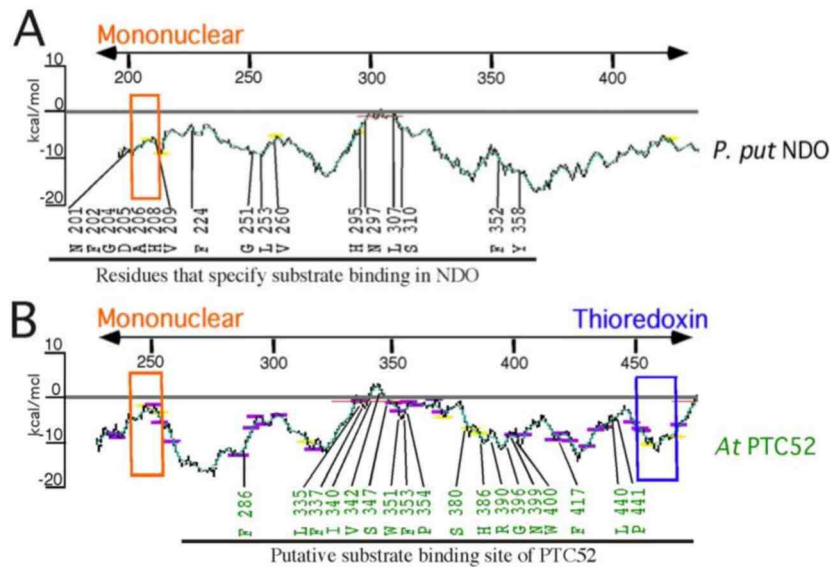


Figure 10. Identification of uniquely conserved residues in the predicted substrate binding site of PTC52 proteins.

(A) Hydropathy plot of substrate binding region of naphthalene dioxygenase (NDO) from *Pseudomonas putida* strain G7 (Kauppi *et al.*, 1998, Karlsson *et al.*, 2003). Hydropathy plots were determined as described in Fig. 1. The mononuclear iron binding motif is highlighted by an orange box. Residues known to coordinate naphthalene and oxygen from crystallographic studies are shown.

(B) Hydropathy plot of predicted substrate binding region of PTC52 protein from *A. thaliana* (see also Supp. Fig. 15). The mononuclear iron binding motif is highlighted by an orange box and the thioredoxin target site is highlighted by a blue box. Residues that are uniquely conserved in the predicted substrate binding region amongst PTC52 proteins but not in PAO, TIC55 or CAO proteins are shown. See Supp. Table 1 for further listing of conserved residues in this region amongst PTC52 related proteins.

The conserved PTC52-specific motif B, Lx₂Fx₂IxVx₄Sx₃Wx₂FP (Supp. Fig. 15), is of particular note because two amino acid substitutions in this region (*acd1-20* S338F and *acd1-E2* G353R) confer strong mutant phenotypes on the most closely related protein PAO in *A. thaliana*. Three other motifs nearer the COOH terminus and in the vicinity of the thioredoxin target motif were found to be signature motifs for the PTC52 clade in land plants (Motif E LPPxP, Motif F AxKx₃ALEx₂LQx₄Ax₂Gx₂A and Motif G AVx₅SxWLx₂Fx₂K). However, the conservation of these motifs with related cyanobacterial proteins was not strong enough to unambiguously assign a PTC52 or PAO function to these proteins (Fig. 1 and Supp. Fig. 15).

Discussion

PTC52 Is an Inner Plastid Envelope Membrane Protein Involved in Pchl *a* Synthesis and pPORA Import

In the present work, the role of PTC52 was examined by genetic and biochemical approaches. A cDNA was isolated for PTC52 of *A. thaliana* which confirmed that the protein contained the same Rieske and mononuclear iron binding motifs as barley PTC52. In addition, AtPTC52 contains the CxxC motif found in other PTC52, TIC55 and PAO sequences. The mononuclear binding site may complex iron via two His residues and one carboxylate within the (EN_{x2}DX₂Hx₄H) motif forming a His-1-carboxylate facial triad (Lange et al., 1998). The CxxC motif operates in dark/light regulation and oxidative control by the thioredoxin system (Bartsch et al., 2008).

Import and plastid fractionation studies showed that AtPTC52 is synthesized as a larger, ≈57 kDa precursor which is imported into isolated barley and *A. thaliana* chloroplasts and processed to mature size. The mature 52 kDa protein was embedded into the inner plastid envelope membrane presumably via three or four *trans*-membrane segments and interacted with PTC130, PTC90, PTC/OEP16 and PTC33/TOC33 to establish functional PTC complexes operative in Pchl *a* oxygenation and pPORA import.

Activity measurements demonstrated that AtPTC52 and HvPTC52 indeed exhibit Pchl *a* oxygenase activity *in vitro*. The reaction catalyzed by AtPTC52 and HvPTC52 likewise required FD and a FD-reducing system, comprising FNR, glucose-6-phosphate and glucose-6-phosphate dehydrogenase, as well as Pchl *a* and O₂. The same co-factor requirements were found for PTC complexes containing PTC52 from barley and *A. thaliana* chloroplasts. Most likely, FD and FNR supplied electrons for the reaction. Interestingly, also TIC55, presumably in conjunction with another TIC protein named TIC62, interacted with FNR and stromal FD (Küchler et al., 2002). It is intriguing to suppose that electron chains may be involved in sensing the redox state of the chloroplast and adjusting protein import to the respective needs of photosynthesis and other metabolic processes. The inner plastid envelope membrane contains at least three different TIC subcomplexes that share common and unique components and accomplish distinct roles in protein import and chlorophyll metabolism (Reinbothe et al., 2006; Bartsch et al., 2008). PTC52, CAO and TIC55 (perhaps also PAO) are distinctive components of these complexes (Reinbothe et al., 2006; Bartsch et al., 2008). Jäger-Vottero et al. (1997) reported the presence of electron chains comprising Fe-S clusters and other iron-sulfur proteins in isolated envelope membranes of spinach chloroplasts that now may be

assigned to these complexes.

Substrate Specificity of PTC52 and Related Proteins

The plant non-heme oxygenases CAO and PAO participate in chlorophyll synthesis and degradation, respectively. Sequence alignments and hydrophilicity profiling (Fig. 1 and Supp. Fig. 15) suggest that PTC52 is much more closely related to PAO than CAO and it was therefore somewhat surprising to find that PTC52 exhibited a catalytic activity more similar to CAO and that the enzyme did not accept either Chlide *a* or Pheophorbide *a* as substrates. We sought to determine whether there are conserved residues in the substrate binding region of PTC52 and related non-heme oxygenases that may illuminate the issue of substrate specificity in this family of enzymes. A substrate binding-domain for these proteins is suggested by comparison with naphthalene dioxygenase (NDO) from the soil bacterium *Pseudomonas* and whose structure has been determined at a resolution of 1.8 Å (Kauppi et al., 1998; Karlsson et al., 2003). The 17 residues that contribute to the topology of the substrate pocket of NDO include the mononuclear motif (N201-V209) and residues extending towards the COOH motif (F234 to Y358) (Fig. 10). Amino acid substitutions in the same region are documented to affect the substrate range of the non-heme oxygenase vanillate demethylase from *Acinetobacter* (Morawski et al., 2000). The corresponding region in PTC52 lies between the mononuclear and CxxC motifs and contains 18 residues (Fig. 1B) that are conserved uniquely in land plant PTC52 proteins but not in the closely related PAO, TIC55 and CAO non-heme oxygenases. An alignment of this putative substrate-binding domain (see also Supp. Fig. 15) revealed several regions of homology separated by variable regions 1-3 whose length differs amongst different family members. The invariant residues in the predicted substrate binding region include 2 prolines, 2 aspartic acids, 1 arginine, 1 phenylalanine and 1 tryptophan (Supp. Fig. 15). Together, these residues may help create a hydrophobic pocket for the substrate. Only the L378 and L384 residues of PTC52 in the predicted substrate binding site (Supp. Fig. 15) appear to be uniquely conserved in this region between PTC52 proteins and CAO proteins – other conserved residues are present in either PAO, which acts on Pheophorbide *a*, or TIC55, which has an unknown pigment binding specificity. Indeed our alignments indicate stronger homology between PTC52 and PAO rather than CAO. Furthermore it was unclear if the *N. sp* ALR4354 and TeP1779 oxygenases from cyanobacteria were more closely related to plant PTC52 or PAO, suggesting that these plant proteins evolved more recently from a common ancestor than CAO. An examination of algal genomes revealed several PAO and PTC52-like genes but the absence of ESTs to support the

predicted genes did not allow the unambiguous discernment of PTC52 proteins in those genomes. Biochemical evidence supports the presence of a PTC52 function in *Chlamydomonas* (Bednarik and Hooper, 1974). In conclusion, we do not observe a binding/catalytic domain with more than two residues unique to PTC52 and CAO, but our alignment does reveal several amino acid residues unique to each clade which may be further investigated for insights into the substrate specificity of this group of non-heme oxygenases.

Role of PTC52 during Plant Development

One of the most remarkable findings of this study is the detection of embryo lethality in *Atptc52/Atptc52* homozygous plants. This result unveils an essential role of PTC52 for higher plants. Our data are reminiscent of observations made for other embryo-lethal mutants of *A. thaliana* that lack key components of the protein import machinery of the outer and inner plastid envelope membranes, such as TOC75 and TIC110 (*Attoc75-III* and *Attic110*) (Inaba et al., 2005; Kovacheva et al., 2005). Both proteins have established roles in import: TOC75 as hydrophilic membrane channel protein in precursor translocation across the outer envelope (Hinnah et al., 1997, 2002) and TIC110 as multifunctional component of the inner envelope translocase (Kessler and Blobel, 1996; Heins et al., 1998; Inaba et al., 2003; Balsera et al., 2008). Other knockout mutants for prominent TOC and TIC components were not embryo-lethal and displayed different phenotypes. For example, *Attoc159* mutant plants were seedling-lethal (Bauer et al., 2000), whereas *Attoc120* and *Attoc130* knockout seedlings showed no or only weak phenotypes (Ivanova et al., 2004; Kubis et al., 2004). In combination, however, *Attoc120* and *Attoc130* double mutants were lethal. Similarly, loss-of-function mutation in TIC40, a human co-chaperone, HSP70-interacting protein (Hip) homologue (Bédard et al., 2007), and the CLP C-type HSP93 provoked only slight effects on import, chlorophyll biosynthesis and photosynthesis, but abrogated development when present at the same time (Chou et al., 2003; Constan et al., 2004; Ivanova et al., 2004; Kovacheva et al., 2005). Together, these few examples suggest overlapping roles for some but not all of the different members of the receptor and chaperone families of chloroplasts. In contrast to these results, our data clearly show that the inner envelope Rieske proteins TIC55, CAO and PAO were unable to replace PTC52 in *Atptc52* plants. This result underscores the highly specialized functions these proteins accomplish during plastid biogenesis and plant development.

How can the embryo-lethal phenotype of *Atptc52* knockout plants be explained?

Conceptually, embryo lethality may result from defects in key structural components and biochemical pathways needed for proper embryo development or perturbations in respective key regulatory networks. The fact that PTC52 is an abundant protein of the inner envelope membranes of barley and *A. thaliana* plastids and has Pchlide *a* oxygenase activity seems to be in favour of a structural and catalytic role in plastid biogenesis. *A. thaliana* and other angiosperms require a period of transient photosynthesis activity during embryo maturation (Yakovlev and Zhukova, 1980; Medford and Sussex, 1989; Fyk et al., 1995). Light-driven water cleavage is thought to provide a mechanism to overcome the oxygen limitation which is encountered in the developing seed owing to the gas impermeability of the seed coat (Borisjuk et al., 2002, 2003). Details of how the photosynthetic apparatus may be established during embryogenesis are largely unknown. Model studies carried out for somatic carrot embryos have confirmed the expression of photosynthetic proteins such as the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, LHCB3, a Chl *b*-containing light-harvesting protein of photosystem II, and POR (Sato-Nara et al., 2004). Although no data have been published whether the detected *POR* transcript encodes a PORA, PORB or PORC protein (Armstrong et al., 1995; Su et al., 2001; Pattanayak and Tripathy, 2002), it is tempting to speculate that any imbalance in Pchlide homeostasis, as evidenced by the experiments described in Figs. 3 and 4 for heterozygous *AtPTC52-1/Atptc52-1* plants, prevents/perturbs the correct assembly of the photosynthetic apparatus in immature embryos. Just at the cotyledon stage the embryo begins to establish the photosynthetic apparatus, and homozygous *AtPtc52-1/Atptc52-1* siliques aborted their embryos precisely at this stage. We propose that the uncontrolled accumulation of free Pchlide *a* molecules in *Atptc52-1* embryos provoked singlet oxygen production and photooxidative damages, including cytotoxic effects and genetic signalling cascades (see Kim et al., 2008, for review), that caused cell death.

Evolution of *PTC52* and Related Genes in Relation to the Chlorophyll Biosynthetic Pathway

The detection of Pchlide *b* in higher plants has been a matter of dispute for more than four decades (Bogorad, 1967; Shedbalkar et al., 1991; Scheumann et al., 1999; Reinbothe et al., 2003a; Kolossov and Rebeiz, 2004; Phillipar et al., 2007; Pollmann et al., 2007; Schemenewitz et al., 2007). The Bogorad laboratory originally formulated the concept of a branched chlorophyll biosynthetic pathway already beginning at the stage of Pchlide *a* and leading to two independent routes of Chl(ide) *b* synthesis (Bogorad, 1967). With the

identification of Pchlide *b* and *PTC52* genes and respective orthologs in different plant phyla and taxa (Fig. 1, see also Shedbalkar et al., 1991; Reinbothe et al., 2003a; Kollosov and Rebeiz, 2004; Pollmann et al., 2007) and especially the detection of *PTC52*'s activity as Pchlide *a* oxygenase (Fig. 5 and Table 2), these earlier results now find some new support. We propose Pchlide *b* to have two major roles in plant development: one in embryo maturation (this study) and one in plant de-etiolation after seed germination (Reinbothe et al., 1999), where the pigment could likewise be part of a photoprotective mechanism involving POR. It remains to be determined if this protective role underlies the presence of 4 tandem repeats of the *PTC52* gene in the rice genome (Yu et al., 2002). The detection of a *PTC52* gene (Fig. 1) and a *POR* gene (Suzuki and Bauer, 1995) in *Synechocystis* supports the notion that in primordial plastids *PTC52* may have served as porphyrin scavenger that evolved to sense the partial O₂ pressure and to control the assembly of the photosynthetic membrane complexes containing POR (Reinbothe et al., 1996b). In line with this notion, mutants of *Synechocystis* that lack POR are light-hypersensitive and impaired in normal photosynthetic function (He et al., 1998). Work is in progress to further study the role of *PTC52* homologs in *Synechocystis* and higher plants.

Materials and Methods

Plant Growth

Seeds of *A. thaliana* ecotype Columbia or barley (*Hordeum vulgare* cv. Carina) were germinated at 25 °C and grown either in complete darkness or under continuous white light illumination provided by fluorescent bulbs (50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) for 4-5 days. Under these conditions, *A. thaliana* seedlings just develop up to the cotyledonary stage, whereas barley seedlings establish the first (primary) leaf that accomplishes the role of the cotyledons.

Identification of *PTC52*-Knockout Mutants of *A. thaliana*

The T-DNA insertion line (SALK_011945) in the *AtPTC52* gene (At4g26560) was identified in the T-DNA collection of the Salk Institute Genome Analysis Laboratory (Alonso et al., 2003). The following primers were used for the PCR screening: LBA1, TCAATGGCCTTGTCAGACACAG; Ptc52-F, TGATTTGCGGGTGATAAGGGA; Ptc52-R, TCCCTGCGAATCAATAGCAACA (Innis et al., 1990). Siliques of *AtPTC52/Atptc52* plants were observed using a dissecting microscope, and embryos were inspected with Nomarski optics. An independent knock-out line was obtained from the Syngenta collection (Garlic_148_H05.b.1a.Lb3Fa; identical with SAIL_148.HC5; Sessions et al., 2002) that showed basically the same phenotypic properties.

DNA Constructs and Protein Expression

Full-length cDNA encoding *A. thaliana* transit peptide-containing or transit peptide-less forms of PTC52 (AtpPTC52 and AtPTC52, respectively) bearing hexa-histidine [(His)₆] tags at their COOH termini were isolated as described (Gray et al., 2004). cDNA clones encoding the pPORA and pPORB of barley, the small subunit precursor of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (SSU) of soybean, precursor ferredoxin (FD) of *Silene pratensis* and the precursors to LHCII have been detailed elsewhere (Reinbothe et al., 2005, 2006). ³⁵S-Proteins were synthesized in wheat germ lysates by coupled *in vitro* transcription/translation or produced in *Escherichia coli* and purified via Ni-NTA chromatography to approximately 85 % homogeneity. DNA sequencing used to confirm the identity of the generated clones was carried out by GATC Biotech AG (Constance, Germany).

Biocomputational Methods and Sequence Data Sources

Multiple sequence alignments were performed using Clustal W method with Gonnet 250 residue weights within the Megalign® program (DNASar, Madison, WI). Unrooted phylograms were generated by using the PAUP 4.0b10 program (Swofford, 2001). The bootstrap method was performed for 1000 replicates with a maximum parsimony criterion. All characters were weighted equally. Starting trees were obtained by random stepwise addition and the tree-bisection-reconnection algorithm was used for branch swapping. Amino acid sequences of proteins were predicted from available GenBank files and genome databases (www.phytozome.net and www.maizesequence.org). Predicted proteins were supported in most cases by full length cDNAs and ESTs and in a few instances aligned ESTs were used to correct the predicted protein. Genbank Accession numbers are listed below and where conceptual translation was used the nucleotide co-ordinates are also supplied: *At* (*Arabidopsis thaliana*) CAO (AAD54323), *AtPAO* (NP_190074.1), *AtTIC55* (NP_180055.1), *AtPTC52* (NP_567725.1); *Os* (*Oryza sativa*) CAO (NP_001065433.1), *OsPAO* (EAY88539.1), *OsTIC55* (NP_001048363.10, *OsPTC52-1* (NM_0010581650; *Pp* (*Physcomitrella patens*) CAO-2 (XP_001777722), *PpPAO-1* (XP_001781796.1), *PpTIC55-1* (XP_001772643.1), *PpPTC52* (XP_001753171.1); *Zm* (*Zea mays*) CAO-2 (AC186790 77334..77408, 77636..77878, 77994..78098, 78210..78494, 78596..78743, 79088..79272, 79363..79475, 79571..79865, 79981..80163), *ZmPAO* (AAC49678.1), *ZmTIC55* (AC186589.3 95605..95211, 95100..94998, 94904..93786), *ZmPTC52* (AC201906 100194..99500, 99359..99259, 98836..98694, 98565..98365, 98228..98041, 97936..97678); *N.sp* (*Nostoc* sp. PCC 7120) ALR4354 (NP_488394.1), *N.sp* ALR5007 (NP_489047.1); *Np* (*Nostoc punctiforme* PCC 73102) F1863 (YP_001865463.1); *Te* (*Trichodesmium erythraeum* IMS101) P1779 (ZP_00072570); and *Synechocystis* sp. PCC 6803 SLR1747 (NP_441106). Naphthalene dioxygenase (NahAc) sequence was from *Pseudomonas putida* strain G7 (JN0644). Proteins from *Populus trichocarpa* (*Pt*) were identified using BLAST against the complete genome (JGI v1.1 at www.phytozome.net V3.0). The coordinates of these genes are *Pt*CAO-1 (linkage group V, 11564764..11564841,5803690..5803448, 11565753..11565857,11566086..11566361,11566581..11566728,11566834..11567019,11567142..11567254,11567802..11568096,11568251..11568421), *Pt*PAO-1 (Scaffold 163, 245278..244864,244482..244243,244126..243996,243079..242939,242320..242157,240835..240551,240203..239945), *Pt*TIC55-1 (linkage group XVIII, 6507907..6507476,6507175..6507069,6506905..6505781) and *Pt*PTC52 (linkage group I, 399368..398831,398456..398259,397953..397866,397796..397608,397433..397242,396688..3

96492,396417..396156).

Plastid Isolation, Manipulation, and Protein Import

Plastids were isolated from surface-sterilized leaf tissues by differential centrifugation and Percoll/sucrose density centrifugation (Reinbothe et al., 1995). Protein import was studied in 50 μ L import mixtures consisting of 25 μ L of doubly-concentrated import buffer, 10 μ L of Percoll-purified, intact, energy-depleted, re-suspended plastids ($5 \cdot 10^7$), and 5 μ L of urea-denatured, radiolabeled precursors (final 0.2 M urea concentration). Mg-ATP and Mg-GTP were added to the final concentrations indicated in the text (Reinbothe et al., 2004a). For the experiment described in Fig. 9, the assays were supplemented with a solution of DEPC to provide the final inhibitor concentrations. If needed, doubly-distilled water was added to adjust the final reaction volume. All assay mixtures were assembled on ice under a dim green safe-light; the actual import reactions were performed at 23 °C for 15 min in darkness. Post-import protease treatment of re-isolated plastids was performed with thermolysin (Cline et al., 1984). Salt extraction of membranes was achieved with either 0.1 M sodium carbonate, pH 11, or 1 M NaCl (Cline et al., 1984). Plastid fractionation into envelopes, stroma and thylakoids was carried out according to Li et al. (1991) or Schnell et al. (1994). Protein was precipitated with trichloroacetic acid (TCA) (5 % (w/v) final concentration) and resolved by SDS-PAGE on 10-20 % (w/v) polyacrylamide gradients (Laemmli, 1970) under reducing or non-reducing conditions (Reinbothe et al., 1990, 2004b). Precursor and mature proteins were detected by autoradiography. Two-dimensional separations, including isoelectric focusing in the first dimension and SDS-PAGE in the second dimension, were carried out according to Scharf and Nover (1982).

Measurement of PTC52 Activity

PTC52 activity was measured using established procedures with either the *in vitro*-expressed, wheat germ-translated and purified At/HvpPTC52 and At/HvPTC52 proteins or functional PTC complexes containing PTC52 that had been isolated from detergent-solubilized OM-IM junction complexes of barley and *A. thaliana* chloroplasts (Reinbothe et al., 2004a; Bartsch et al., 2008). Final 50 μ L assays contained the following supplements: 2 mM Pchl *a*, Chl *a* or Pheophorbide *a*, 10 μ g of FD (Sigma) and a FD-reducing system [2 mM glucose-6-phosphate; 1 mM NADPH; 50 milliunits (mU) of glucose-6-phosphate dehydrogenase; 10 milliunits

(mU) of FD-NADPH-oxidoreductase (FNR) (Sigma)] (modified after Oster et al., 2000, and Pruzinska et al., 2003). Final PTC52 protein concentrations for *in vitro*-activity measurements were 60-100 µg/mL. Activity measurements with Pheophorbide *a* (Reinbothe et al., 2006; Bartsch et al., 2008) included *in vitro*-expressed red chlorophyll catabolite reductase (RCCR) from *A. thaliana* (Pruzinska et al., 2003).

Pigment Measurements

Pigments were extracted with 100 % acetone containing 0.1 % DEPC and separated by HPLC on a C18 reverse phase silica gel column (Shandon, Hypersil ODS, 5 µm), using synthetic Pchlides *a* and *b* as references (Reinbothe et al., 2003a, 2003b). Pigment identification and quantification were made at 455 nm, using a photodiode array detector. Mass spectroscopy of HPLC-separated pigments was performed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (Voyager DE STR Biospectrometry Work Station, Foster City, CA). As reference, 10 µg of Pchlides *b* was mixed with terthiophene (used as matrix) dissolved in acetone.

Crosslinking

Treatment of chloroplasts bearing imported ³⁵S-pPORA with dithiobis(succinidyl propionate) (DSP), processing of the plastids, and subsequent membrane solubilization were essentially as described by Lübeck et al. (1996).

Immunological Techniques

Immunoprecipitation and co-precipitation were carried out according to Wiedmann et al. (1987), using the antisera specified in the text. Western blotting was done according to Towbin et al. (1979), using anti-rabbit, anti-goat, alkaline phosphatase-based or enhanced chemiluminescence (ECL)-based (Amersham-Pharmacia) detection systems.

References

- Akita, M., Nielsen, E., and Keegstra, K.** (1997) Identification of protein transport complexes in the chloroplastic envelope membranes via chemical crosslinking. *J. Cell Biol.* **136**, 983-994.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R. et al.** (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**, 653-657.
- Armstrong, G.A., Runge, S., Frick, G., Sperling, U., and Apel, K.** (1995) Identification of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductases A and B: a branched pathway for light-dependent chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **108**, 1505-1517.
- Baldwin, A., Wardle, A., Patel, R., Dudley, P., Park, S.K., Twell, D., Inoué, K., and Jarvis, P.** (2005) A molecular-genetic study of the *Arabidopsis* Toc75 gene family. *Plant Physiol.* **138**, 715-733.
- Balsera, M., Goetze, T.A., Kovács-Bogdán, E., Schürmann, P., Wagner, R., Buchanan, B.B., and Soll, J., and Bölter, B.** (2008) Characterization of TIC110, a channel-forming protein at the inner envelope membrane of chloroplasts, unveils a response to Ca²⁺ and a stromal regulatory disulfide bridge. *J. Biol. Chem.*, Epub ahead of print.
- Bartsch, S., Monnet, J., Selbach, K., Quigley, F., Gray, J., von Wettstein, D., Reinbothe, S., Reinbothe, C.** (2008) Three new thioredoxin targets in the inner plastid envelope membrane function in protein import and chlorophyll metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 4933-4938.
- Bauer, J., Chen, K., Hiltbrunner, A., Wehrli, E., Eugster, M., Schnell, D., and Kessler, F.** (2000) The major protein import receptor of plastids is essential for chloroplast biogenesis. *Nature* **403**, 203-207.
- Bédard, J., and Jarvis, P.** (2005) Recognition and envelope translocation of chloroplast preproteins. *J. Exp. Bot.* **56**, 2287-320.
- Bédard, J., Kubis, S., Bimanadham, S., and Jarvis, P.** (2007) Functional similarity between the chloroplast translocon component, Tic40, and the human co-chaperone, Hsp70-interacting protein (Hip). *J. Biol. Chem.* **282**, 21404-2114.
- Bednarik, D.P., and Hooper, J.K.** (1985) Synthesis of chlorophyllide *b* from protochlorophyllide in *Chlamydomonas reinhardtii* *y-1*. *Science* **230**, 450-453.
- Bogoard, L.** (1967) Chlorophyll biosynthesis. in: *Chemistry and Biochemistry of plant pigments* (T.W. Goodwin, ed.), Vol. I, Academic press, London, pp. 64-148.

- Bölter, B., May, T., and Soll, J.** (1998) A protein import receptor in pea chloroplasts, TOC86, is only a proteolytic fragment of a larger polypeptide. *FEBS Lett.* **441**, 59-62.
- Borisjuk L., Rolletschek, H., Walenta, S., Panitz, R., Wobus, U., and Weber, H.** (2003) Energy status and its control on embryogenesis of legumes: ATP distribution within *Vicia faba* embryos is developmentally regulated and correlated with photosynthetic capacity. *Plant J.* **36**, 318-29.
- Borisjuk, L., Walenta, S., Rolletschek, H., Mueller-Klieser, W., Wobus, U., and Weber, H.** (2002) Spatial analysis of plant metabolism: sucrose imaging within *Vicia faba* cotyledons reveals specific developmental patterns. *Plant J.* **29**, 521-530.
- Caliebe, A., Grimm, R., Kaiser, G., Lübeck, J., Soll, J., and Heins, L.** (1997) The chloroplastic protein import machinery contains a Rieske-type iron-sulfur cluster and a mononuclear iron-binding protein. *EMBO J.* **16**, 7342-7350.
- Chen, K., Chen, X., and Schnell, D.J.** (2000) Initial binding of preproteins involving the Toc159 receptor can be bypassed during protein import into chloroplasts. *Plant Physiol.* **122**, 811-822.
- Chen, X., Smith, M.D., Fitzpatrick, L., and Schnell, D.J.** (2002) *In vivo* analysis of the role of atTic20 in protein import into chloroplasts. *Plant Cell* **14**, 641-654.
- Chiu, C.C., and Li, H.M.** (2008) Tic40 is important for reinsertion of proteins from the chloroplast stroma into the inner membrane. *Plant J.* **56**, 793-801.
- Chou, M.L., Chu, C.C., Chen, L.J., Akita, M., and Li, H.M.** (2006) Stimulation of transit-peptide release and ATP hydrolysis by a cochaperone during protein import into chloroplasts. *J. Cell Biol.* **175**, 893-900.
- Chou, M.-L., Fitzpatrick, L.M., Tu, S.-L., Budziszewski, G., Potter-Lewis, S., Akita, M., Levin, J.Z., Keegstra, K., and Li, H.-m.** (2003) Tic40, a membrane-anchored co-chaperone homolog in the chloroplast protein translocon. *EMBO J.* **22**, 2970-2980.
- Cline, K., Werner-Washburne, M., Andrews, J., and Keegstra, K.** (1984) Thermolysin is a suitable protease for probing the surface of intact pea chloroplasts. *Plant Physiol.* **75**, 675-678.
- Constan, D., Froelich, J.E., Rangarajan, S., and Keegstra, K.** (2004) A stromal Hsp100 protein is required for normal chloroplast development and function in *Arabidopsis*. *Plant Phys.* **136**, 3605-3615.
- Crowe, L.M., and Crowe, J.H.** (1984) Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science* **223**, 701-703.

- Crowe, L.M., Mouradian, R., Crowe, J.H., Jackson, S.A., and Womersley, C.** (1984) Effects of carbohydrates on membrane stability at low water potentials. *Biochim. Biophys. Acta* **769**, 141-150.
- Espineda, C. E., Linford, A. S., Devine, D., and Brusslan, J. A.** (1998) The AtCAO gene, encoding chlorophyll *a* oxygenase, is required for chlorophyll *b* synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **96**, 10507-10511.
- Ferro, M., Salvi, D., Rivière-Rolland, H., Vermat, T., Seigneurin-Berny, D., Grunwald, D., Garin, J., Joyard, J., and Rolland, N.** (2002) Integral membrane proteins of the chloroplast envelope: Identification and subcellular localization of new transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 11487–11492.
- Ferro, M., Salvi, D., Brugière, S., Miras, S., Kowalski, S., Louwagie, M., Garin, J., Joyard, J., and Rolland, N.** (2003) Proteomics of the chloroplast envelope membranes from *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Cell. Proteomics* **25**, 325-345.
- Fyk, B., Bednara, J., and Rodkiewicz, B.** (1995) Chlorophyll autofluorescence in globular and heart-shaped embryos of some dicotyledons. *Acta Soc. Bot. Pol.* **65**, 161-166.
- Gray, M.W.** (1992) The endosymbiont hypothesis revisited. *Int. Rev. Cytol.* **141**, 233–357.
- Gray, J., Close, P.S., Briggs, S.P., and Johal, G.S.** (1997) A novel suppressor of cell death in plants encoded by the *lls1* gene of maize. *Cell* **89**, 25-31.
- Gray, J., Janick-Buckner, D., Buckner, B., Close, P.S., and Johal, G.S.** (2002) Light-dependent death of maize *lls1* cells is mediated by mature chloroplasts. *Plant Physiol.* **130**, 1-14.
- Gray, J., Wardzala, E., Yang, M., Reinbothe, S., Haller, S., and Pauli, F.** (2004) A small family of LLS1-related non-heme oxygenases in plants with an origin amongst oxygenic photosynthesizers. *Plant Mol. Biol.* **54**, 39-54.
- Gross, J., and Bhattacharya D.** (2009) Revaluating the evolution of the Toc and Tic protein translocons. *Trends Plant Sci.* **14**, 13-20.
- Gutensohn, M., Schulz, B., Nicolay, P., and Flügge, U.-I.** (2000) Functional analysis of the two *Arabidopsis* homologues of Toc34, a component of the chloroplast protein import machinery. *Plant J.* **23**, 771-783.
- He, Q., Brune, D., Nieman, R., and Vermaas, W.** (1998) Chlorophyll *a* synthesis upon interruption and deletion of *por* coding for the light-dependent NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase in a photosystem-I-less/*chlL*-strain of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Eur. J. Biochem.* **253**, 161-172.

- Heins, L., Collins, I., and Soll, J.** (1998) The protein translocation apparatus of chloroplast envelopes. *Trends Cell Biol.* **7**, 303-304.
- Hiltbrunner, A., Grünig, K., Alvarez-Huerta, M., Infanger, S., Bauer, J., and Kessler, F.** (2004) AtToc90, a new GTP-binding component of the Arabidopsis chloroplast protein import machinery. *Plant Mol. Biol.* **54**, 427-440.
- Hinnah, S.C., Hill, K., Wagner, R., Schlicher, T., and Soll, J.** (1997) Reconstitution of a chloroplast protein import channel. *EMBO J.* **16**, 7351-7360.
- Hinnah, S.C., Wagner, R., Sveshnikova, N., Harrer, R., and Soll, J.** (2002) The chloroplast protein import channel Toc75: pore properties and interaction with transit peptides. *Biophys. J.* **83**, 899-911.
- Hirsch, S.E., Muckel, F., Heemeyer, G., von Heijne, G., and Soll, J.** (1994) A receptor component of the chloroplast protein translocation machinery. *Science* **266**, 1989-1992.
- Hofmann, N.R., and Theg, S.M.** (2005) Chloroplast outer membrane protein targeting and insertion. *Trends Plant Sci.* **10**, 450-457.
- Inaba, T., Li, M., Alvarez-Huerta, M., Kessler, F., and Schnell, D.J.** (2003) atTic110 functions as a scaffold for coordinating the stromal events of protein import into chloroplasts. *J. Biol. Chem.* **278**, 38617-38627.
- Inaba, T., Alvarez-Huerta, M., Li, M., Bauer, J., Ewers, C., Kessler, F., and Schnell, D.J.** (2005) *Arabidopsis* tic 110 is essential for the assembly and function of the protein import machinery of plastids. *Plant Cell* **17**, 1482-1496.
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., and White, T.J.** (1990) *PCR Protocols* (Academic Press, San Diego, CA).
- Inoue, H., and Akita, M.** (2008) Three sets of translocation intermediates are formed during the early stage of protein import into chloroplasts. *J. Biol. Chem.* **283**, 7491-7502.
- Ivanova, Y., Smith, M.D., Chen, K., and Schnell, D.J.** (2004) Members of the Toc 159 import receptor family represent distinct pathways for protein targeting to plastids. *Mol. Biol. Cell* **15**, 3379-92.
- Jäger-Vottero, P., Dorne, A.-J., Jordanov, J., Douce, R., Joyard, J.** (1997) Redox chains in chloroplast envelope membranes: spectroscopic evidence for the presence of electron carriers, including iron-sulfur centres. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1597-1602.
- Jarvis, P., Chen, L.-J., Li, H.-m., Peto, C.A., Fankhauser, C., and Chory, J.** (1998) An *Arabidopsis* mutant defective in the plastid general protein import apparatus. *Science* **282**, 100-103.

- Jelic, M., Sveshnikova, M., Motzkus, P., Horth, P., Soll, J., Schleiff, E.** (2002) The chloroplast import receptor Toc34 functions as preprotein-regulated GTPase. *Biol. Chem.* **383**, 1875-1883.
- Jelic, M., Soll, J., and Schleiff, E.** (2003) Two Toc34 homologues with different properties. *Biochemistry* **42**, 5906-5916.
- Karlsson, A., Parales, J.V., Parales, R.E., Gibbon, D.T., Eklund, H., and Ramaswamy, S.** (2003) Crystal structure of naphthalene dioxygenase: side-on binding of dioxygen to iron. *Science* **299**, 1039-1042.
- Kauppi, B., Lee, K., Carredano, E., Parales, R.E., Gibson, D.T., Eklund, H., and Ramaswamy, S.** (1998) Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase-naphthalene 1,2-dioxygenase. *Structure* **15**, 571-586.
- Keegstra, K., Olsen, L., and Theg, S.** (1989) Chloroplastic precursors and their transport across the envelope membranes. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* **40**, 471-501.
- Kessler, F., and Blobel, G.** (1996) Interaction of the protein import and folding machineries in the chloroplast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 7684-7689.
- Kessler, F., Blobel, G., Patel, H.A., and Schnell, D.J.** (1994) Identification of two GTP-binding proteins in the chloroplast protein import machineries. *Science* **266**, 1035-1039.
- Kessler, F., and Schnell, D.J.** (2006) The function and diversity of plastid protein import pathways: a multilane GTPase highway into plastids. *Traffic* **7**, 248-257.
- Kim, C., Meskauskiene, R., Apel, K., and Laloi, C.** (2008) No single way to understand singlet oxygen signalling in plants. *EMBO Rep.* **9**, 435-439.
- Kleffmann, T., Russenberger, D., von Zychlinski, A., Christopher, W., Sjolander, K., Gruissem, W., and Baginsky, S.** (2004) The *Arabidopsis thaliana* chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions. *Curr. Biol.* **14**, 354-362.
- Kolossov, V.L., and Rebeiz, C.A.** (2004) Chloroplast biogenesis 88. Protochlorophyllide *b* occurs in green but not in etiolated plants. *J. Biol. Chem.* **278**, 49675-49678.
- Kouranov, A., and Schnell, D.J.** (1997) Analysis of the interaction of preproteins with the import machinery over the course of protein import into chloroplasts. *J. Cell Biol.* **139**, 1677-1685.
- Kouranov, A., Chen, X., Fuks, B., and Schnell, D.** (1998) Tic20 and Tic22 are new components of the protein import apparatus at the chloroplast inner envelope membrane. *J. Cell Biol.* **143**, 991-1002.
- Kouranov, A., Wang, H., and Schnell, D.J.** (1999) Tic22 is targeted to the intermembrane space of chloroplasts by a novel pathway. *J. Biol. Chem.* **274**, 25181-25186.

- Kovacheva, S., Bédard, J., Patel, R., Dudley, P., Twell, D., Rios, G., Koncz, C., and Jarvis, P.** (2005) *In vivo* studies on the roles of Tic110, Tic40 and Hsp93 during chloroplast protein import. *Plant J.* **41**, 412-428.
- Kubis, S., Patel, R., Combe, J., Bédard, J., Kovacheva, S., Lilley, K., Biehl, A., Leister, D., Riéos, Koncz, C., and Jarvis, P.** (2004) Functional specialization amongst the *Arabidopsis* Toc159 family of chloroplast protein import receptors. *Plant Cell* **16**, 2059-2077.
- Küchler, M., Decker, S., Hörmann, F., Soll, J., and Heins, L.** (2002) Protein import into chloroplasts involves redox-regulated proteins. *EMBO J.* **21**, 6136-6145.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lange, S.J., and Que Jr, L.** (1998) Oxygen activating nonheme iron enzymes. *Curr. Opin. in Chem. Biol.* **2**, 159-172.
- Li, H.-m., Moore, T., and Keegstra, K.** (1991) Targeting of proteins to the outer envelope membrane uses a different pathway than transport into chloroplasts. *Plant Cell* **3**, 709-717.
- Lübeck, J., Soll, J., Akita, M., Nielsen, E., and Keegstra, K.** (1996) Topology of IEP110, a component of the chloroplastic protein import machinery present in the inner envelope membrane. *EMBO J.* **15**, 4230-4238.
- Ma, Y., Kouranov, A., LaSala, S.E., and Schnell, D.J.** (1996) Two components of the chloroplast protein import apparatus, IAP86 and IAP75, interact with the transit sequence during the recognition and translocation of precursor proteins at the outer envelope. *J. Cell Biol.* **134**, 315-327.
- Margulis, L.** (1970) *Origin of eukaryotic cells*. (Yale Univ. Press, New Haven, CT).
- Martin, W., and Müller, M.** (1998) The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* **392**, 37-41.
- Martin, W., Stoebe, B., Goremykin, V., Hansmann, S., Hasegawa, M., and Kowallik, K.V.** (1998) Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature* **393**, 162-165.
- Medford, J.I., and Sussex, I.M.** (1989) Regulation of chlorophyll and RuBisCo levels in embryonic cotyledons of *Phaseolus vulgaris*. *Planta* **179**, 309-315.
- Miras, S., Salvi, D., Ferro, M., Grunwald, D., Garin, J., Joyard, J., and Rolland, N.** (2002) Non-canonical transit peptide for import into the chloroplast. *J. Biol. Chem.* **277**, 47770-47778.

- Miras, S., Salvi, D., Piette, L., Seigneurin-Berny, D., Grunwald, D., Reinbothe, C., Reinbothe, S., Joyard, J., , S., and Rolland, N.** (2007) TOC159- and TOC75-independent import of a transit sequence-less precursor into the inner envelope of chloroplasts. *J. Biol. Chem.* **282**, 29482–29492.
- Morawski, B., Segura, A., and Ornston, L.N.** (2000) Substrate range and genetic analysis of *Acinetobacter* vanillate demethylase. *J. Bact.* **182**, 1383–1389.
- Nada, A., and Soll, J.** (2004) Inner envelope protein 32 is imported into chloroplasts by a novel pathway. *J. Cell Sci.* **117**, 3975-1982.
- Nielsen, E., Akita, M., Davila-Aponte, J., and Keegstra, K.** (1997) Stable association of chloroplastic precursors with protein translocation complexes that contain protein from both envelope membranes and a stromal Hsp100 molecular chaperone. *EMBO J.* **16**, 935-946.
- Ohnishi, T., Reinhardt, S.W., von Jagow, G., Yagi, T., and Hateh, Y.** (1994) Effect of ethoxyformic anhydride on the Rieske iron-sulfur protein of bovine heart ubiquinol:cytochrome *c* oxidoreductase. *FEBS Lett.* **353**, 103-107.
- Oster, U., Tanaka, R., Tanaka, A., and Rüdiger, W.** (2000) Cloning and functional expression of the gene encoding the key enzyme for chlorophyll *b* biosynthesis (CAO) from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **21**, 305-310.
- Pattanayak, G.K., and Tripathy, B.C.** (2002) Catalytic function of a novel protein protochlorophyllide oxidoreductase C of *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291**, 921-924.
- Peeters, N., and Small, I.** (2001) Dual targeting to mitochondria and chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* **1541**, 54-63.
- Peltier, J.B., Ytterberg, A.J., Sun, Q., and van Wijk, K.J.** (2005) New functions of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* revealed by a simple, fast, and versatile fractionation strategy. *J. Biol. Chem.* **279**, 49367-49383.
- Perry, S.E., and Keegstra, K.** (1994) Envelope membrane proteins that interact with chloroplastic precursor proteins. *Plant Cell* **6**, 93-105.
- Philippar, K., Geis, T., Ilkavets, I., Oster, U., Schwenkert, S., Meurer, J., and Soll, J.** (2007) Chloroplast biogenesis: the use of mutants to study the etioplast-chloroplast transition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 678-683.

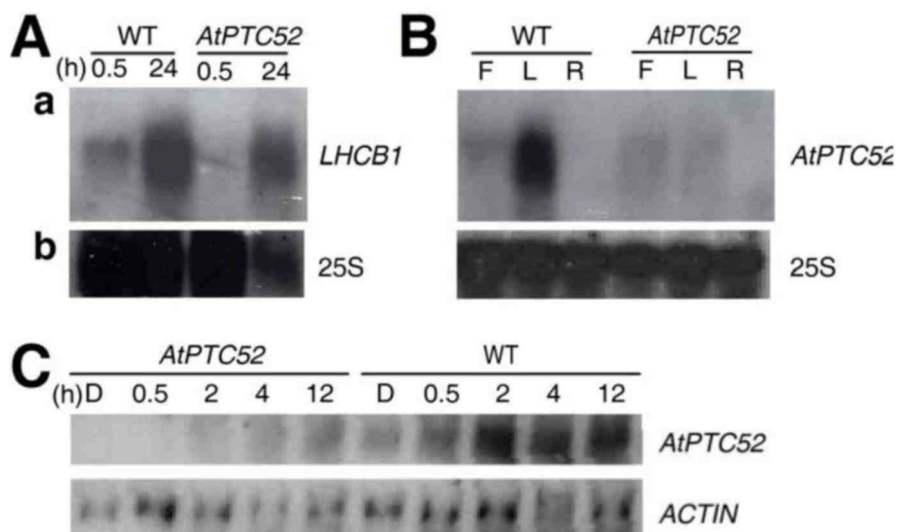
- Pollmann, S., Springer, A., Buhr, F., Lahroussi, A., Samol, I., Bonneville, J.-M. Tichtinsky, G., von Wettstein, D., Reinbothe, C., and Reinbothe, S.** (2007) A plant porphyria related to defects in plastid import of protochlorophyllide oxidoreductase A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 2019-2023.
- Pruzinska, A., Tanner, G., Anders, I., Boca, M., and Hörtensteiner, S.** (2003) Chlorophyll breakdown: Pheophorbide *a* oxygenase is a Rieske-type iron–sulfur protein, encoded by the *accelerated cell death 1* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 15259-15264.
- Rathinasabapathi, B., Burnet, M., Russell, B.L., Gage, D.A., Liao, P.-C., Nye, G. J., Scott, P., Golbeck, J.H., and Hanson, A.D.** (1997) Choline monooxygenase, an unusual iron- sulfur enzyme catalyzing the first step of glycine betaine synthesis in 39 plants: Prosthetic group characterization and cDNA cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 3454-3458.
- Reinbothe, S., Krauspe, R., and Parthier, B.** (1990) Partial purification and characterization of mRNAs for chloroplast and cytoplasmic aminoacyl-tRNA synthetases from *Euglena gracilis*. *J. Plant Physiol.* **137**, 81-87.
- Reinbothe, C., Lebedev, N., and Reinbothe, S.** (1999) A protochlorophyllide light-harvesting complex involved in de-etiolation of higher plants. *Nature* **397**, 80-84.
- Reinbothe, C., Mache, R., and Reinbothe, S.** (2000) A second, substrate-dependent site of protein import into chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 9795-9800.
- Reinbothe, S., Pollmann, S., and Reinbothe, C.** (2003a) *In-situ*-conversion of protochlorophyllide *b* to protochlorophyllide *a* in barley: Evidence for a role of 7-formyl reductase in the prolamellar body of etioplasts. *J. Biol. Chem.* **278**, 800-806.
- Reinbothe, S., Reinbothe, C., Neumann, D., and Apel, K.** (1996a) A plastid enzyme arrested in the step of precursor translocation *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 12026-12030.
- Reinbothe, C., Buhr, F., Pollmann, S., and Reinbothe, S.** (2003b) *In vitro*-reconstitution of LHPP with protochlorophyllides *a* and *b*. *J. Biol. Chem.* **278**, 807-815.
- Reinbothe, S., Reinbothe, C., Apel, K., and Lebedev, N.** (1996b) Evolution of chlorophyll biosynthesis: The challenge to survive photooxidation. *Cell* **86**, 703-705
- Reinbothe, S., Quigley, F., Gray, J., Schemenewitz, A., and Reinbothe, C.** (2004a) Identification of plastid envelope proteins required for the import of protochlorophyllide oxidoreductase (POR) A into the chloroplast of barley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 2197-2202.

- Reinbothe, S., Quigley, F., Springer, A., Schemenewitz, A., and Reinbothe, C.** (2004b) The outer plastid envelope protein Oep16: Role as precursor translocase in import of protochlorophyllide oxidoreductase A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 2203-2208.
- Reinbothe, S., Runge, S., Reinbothe, C., van Cleve, B., Apel, K.** (1995) Substrate-dependent transport of the NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase into isolated plastids. *Plant Cell* **7**, 161-172.
- Reinbothe, S., Pollmann, S., Springer, A., James, R.J., Tichtinsky, G., and Reinbothe, C.** (2005) A role of Toc33 in the protochlorophyllide-dependent protein import pathway of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase (POR) A into plastids. *Plant J.* **42**, 1-12.
- Reinbothe, C., Bartsch, S., Eggink, L.L. Hooper, J.K., Brusslan, I., Andrade-Paz, R., Monnet, J., and Reinbothe, S.** (2006) A role for chlorophyllide *a* oxygenase in the regulated import and stabilization of light-harvesting chlorophyll *a/b* proteins in chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 4777-4782.
- Sato-Nara, K., Demura, T., and Fukuda, H.** (2004) Expression of photosynthesis-related genes and their regulation by light during somatic embryogenesis in *Daucus carota*. *Planta* **219**, 23-31.
- Scharf, K.D., and Nover, L.** (1982) Heat-shock-induced alterations of ribosomal protein phosphorylation in plant cell cultures. *Cell* **30**, 427-437.
- Schemenewitz, A., Pollmann, S., Reinbothe, C., and Reinbothe, S.** (2007) A substrate-independent, 14:3:3 protein-mediated plastid import pathway of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase (POR) A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 8538-8543.
- Scheumann, V., Klement, H., Helfrich, M., Oster, U., Schoch, S., and Rüdiger, W.** (1999) Protochlorophyllide *b* does not occur in barley etioplasts. *FEBS Lett.* **445**, 445-448.
- Schnell, D.J., Kessler, F., and Blobel, G.** (1994) Isolation of components of the chloroplast protein import machinery. *Science* **266**, 1007-1012.
- Schnell, D.J., Blobel, G., Keegstra, K., Ko, K., and Soll, J.** (1997) A consensus nomenclature for the protein-import components of the chloroplast envelope. *Trends Cell Biol.* **7**, 303-304.
- Sessions, A., Burke, E., Presting, G., Aux, G., McElver, J., Dietrich, B., Ho, P., Bacwaden, J., Ko, C. et al.** (2002) A high-throughput *Arabidopsis* reverse genetics system. *Plant Cell* **14**, 2985-2994.

- Shedbalkar, V.P., Ioannidis, I.M., and Rebeiz, C.A.** (1991) Chloroplast biogenesis: detection of monovinyl protochlorophyll(ide) *b* in plants. *J. Biol. Chem.* **266**, 17151-17157.
- Smith, M.D., Rounds, C.M., Wang, F., Chen, K., Afithile, M., and Schnell, D.J.** (2004) atToc159 is a selective transit peptide receptor for the import of nucleus-encoded chloroplast proteins. *J. Cell Biol.* **165**, 323-34.
- Stahl, T., Glockmann C., Soll, J., and Heins, L.** (1999) Tic40, a new "old" subunit of the chloroplast protein import translocon. *J. Biol. Chem.* **274**, 37467-37472.
- Su, Q., Frick, G., Armstrong, G., and Apel, K.** (2001). PORC of *Arabidopsis thaliana*: a third light- and NADPH-dependent protochlorophyllide oxidoreductase that is differentially regulated by light. *Plant Mol. Biol.* **47**, 805-813.
- Suzuki, J.Y., and Bauer, C.E.** (1995) A prokaryotic origin for light-dependent chlorophyll biosynthesis of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 3749—3753.
- Swofford, D. L.** (2001) PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods) (Sunderland, MA: Sinauer Associates).
- Tanaka, A., Ito, H., Tanaka, R., Tanaka, N.K., Yoshida, K., and Okada, K.** (1998) Chlorophyll *a* oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll *b* formation from chlorophyll *a*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 12719-12723.
- Towbin, M., Staehelin, T., and Gordon, J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets; procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- Tranel, P.J., Froehlich, J., Goyal, A., and Keegstra, K.** (1995) A component of the chloroplastic protein import apparatus is targeted to the outer envelope via a novel pathway. *EMBO J.* **14**, 2436-2446.
- Villarejo, A., Buren, S., Larsson, S., Dejardin, A., Monne, M., Rudhe, C., Karlsson, J., Jansson, S., Lerouge, P., Rolland, N., et al.** (2005) Evidence for a protein transported through the secretory pathway *en route* to the higher plant chloroplast. *Nat. Cell Biol.* **7**, 1224-1231.
- White, W.C., and Wimley, S.H.** (1999) Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **28**, 319-365.
- Wiedmann, M., Kurzchalia, T.V., Bielka, H., and Rapoport, T.A.** (1987) Direct probing of the interaction between the signal sequence of nascent preprolactin and the signal recognition particle by specific cross-linking. *J. Cell Biol.* **104**, 201-208.

- Wu, C., Seibert, F.S., and Ko, K.** (1994) Identification of chloroplast envelope proteins in close physical proximity to a partially translocated chimeric precursor protein. *J. Biol. Chem.* **269**, 32264-32271.
- Yakovlev, M.S., and Zhukova, G.Y.** (1980) Chlorophyll in embryos of angiosperm seeds, a review. *Bot Not.* **133**, 323-336.
- Yamasato, A., Nagata, N., Tanaka, R., and Tanaka, A.** (2005) The N-terminal domain of chlorophyllide *a* oxygenase confers protein instability in response to chlorophyll *b* accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**, 1585-1597.
- Yu, J., Hu, S., Wang, J., Wong, G. K.-S., Li, S., Liu, B., Deng, Y., Dai, L., Zhou, Y., Zhang, X., et al.** (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Science* **296**, 79-92.

Supplementary materials



Supp. Fig. 11. Expression of *LHCBI* and *PTC52* transcripts during greening of *AtPTC52-1/Atptc52-1* and wild-type seedlings and in mature plants.

(A) Seeds were grown in the dark for 4 days and subsequently exposed to white light for the indicated periods. mRNA was isolated and separated on agarose gels. After blotting, filter-bound RNAs were hybridized with a *LHCBI* probe. As control, a replicate filter was hybridized with a 25S rRNA probe.

(B), as in (A), but showing the expression of *PTC52* transcripts and 25S rRNA in flowers (F), leaves (L) and roots (R) of 6 weeks-old *AtPTC52-1/Atptc52-1* and wild-type plants.

(C), as in (A), but depicting the expression profile of *PTC52* and *ACTIN* transcripts amongst total RNA during greening of 5-days-old *AtPTC52-1/Atptc52-1* and wild-type seedlings.

```

1  MEAALAACAL PSLRILNTKP RFRCSFSNPS LPISPNSLIT RKSSRFTTAV
   *
51  SSPPSSSAAT STNSPPEPEA LFEPGSDKFD WYANWYPVMP ICDLDDKKVPH
101 GKKVMGIDLV VWWDRNEKQW KVMDDTCPHR LAPLSDGRID QWGRLQCVYH
151 GWCFNGSGDC KLIPQAPPDG PPVHTFKQAC VAVYPSTVQH EIIWFWPNSD
201 PKYKNIIETN KPPYIPELED PSFTKLMGMR DIPYGYDVLV ENLMDPAHVP
251 YAHYGLMRFP KPKEKIDREG GKPLEINVKK LDNKGFFSKQ EWGYSNFIAP
301 CVYRSSTDPL PEQEHEYPAP AASDKAALSK RRLSLIFICI PVSPGRSRLI
351 WTFPRNFGVF IDKIVPRWVF HIGQNTILDS DLHLLHVEER KILERGPENW
401 QKACFIPTKS DANVVTFRRW FNKYSEARVD WRGKFDPFLL PPTPPREQLF

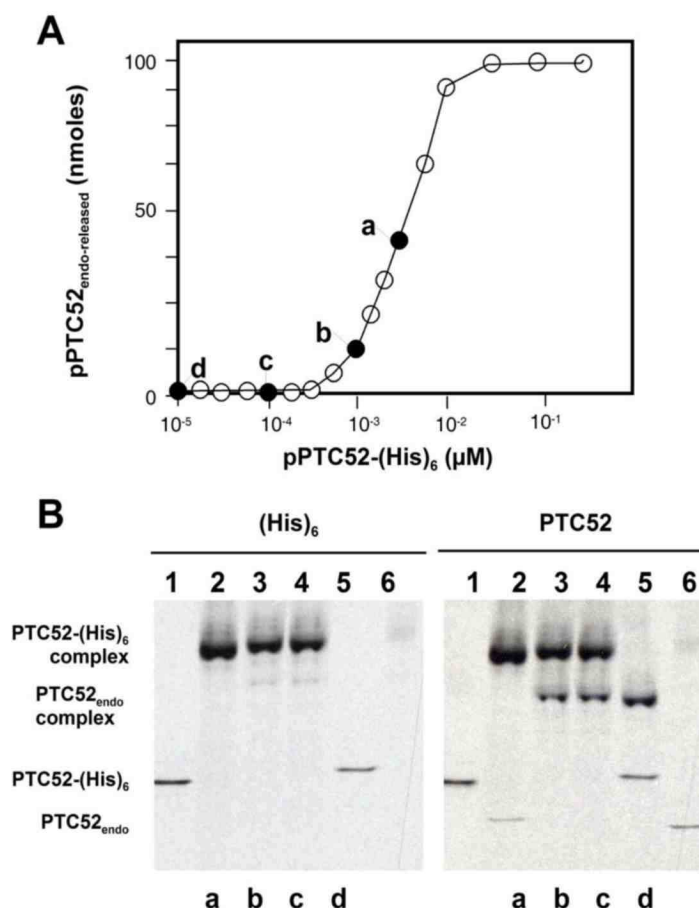
451 DRYWSHVENC SSCKKAHKYL NALEVILQIA SVAMIGVMAV LKQTTMSNVA

501 RIAVLVAAVL SFAASKWLSH FIYKTFHYHD YNHAVV

```

Supp. Fig. 12. Predicted amino acid sequence of the At4g25650 gene product.

The Rieske centre binding motif (C_xH_x₁₆₋₁₇C_xH) and mononuclear iron binding (N_x₂D_x₃₋₄H_x) motif are in bold face. The asterisk marks the potential cleavage site for a chloroplast transit peptide. Predicted *trans*-membrane domains are overlined.

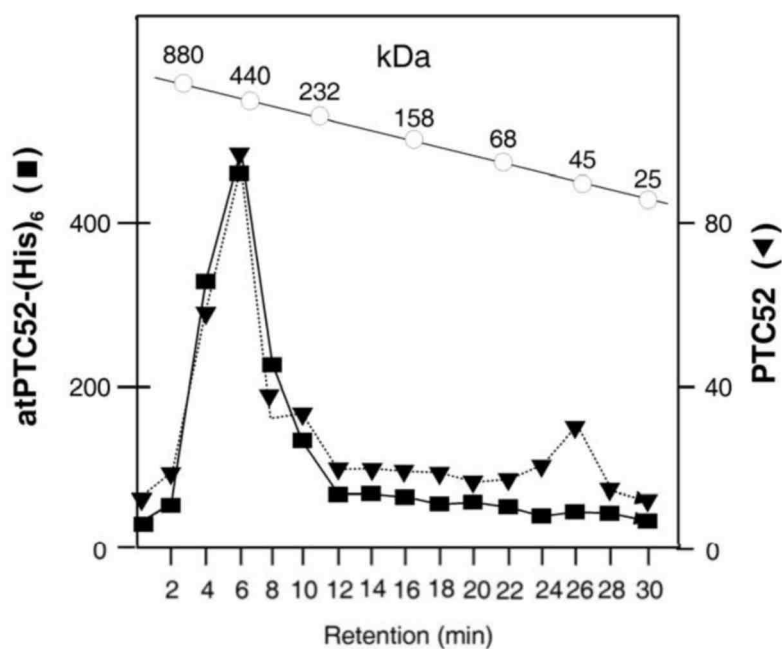


Supp. Fig. 13. Production of AtPTC52-(His)₆-containing complexes in chloroplasts.

(A) Dose-response curve showing the release of the endogenous PTC52 protein from pre-existing PTC complexes *versus* the concentration of added AtPTC52-(His)₆.

(B) Western blot analysis of PTC52-containing complexes using envelope protein extracts prepared at 10 pM (lane 2, corresponding to d in A), 100 pM (lane 3, corresponding to c in A), 1 nM (lane 4, corresponding to b in A) and 2.5 nM (lane 5, corresponding to a in A) concentrations of AtPTC52-(His)₆. Lanes 1 and 6 show respective AtPTC52-(His)₆ and HvPTC52 input standards. The same blot was successively developed with antisera against the (His)₆ tag (left panel) and PTC52 (right panel). Note the differential reactivity of the used antisera and antigens. The gel used was a non-denaturing polyacrylamide gel (1).

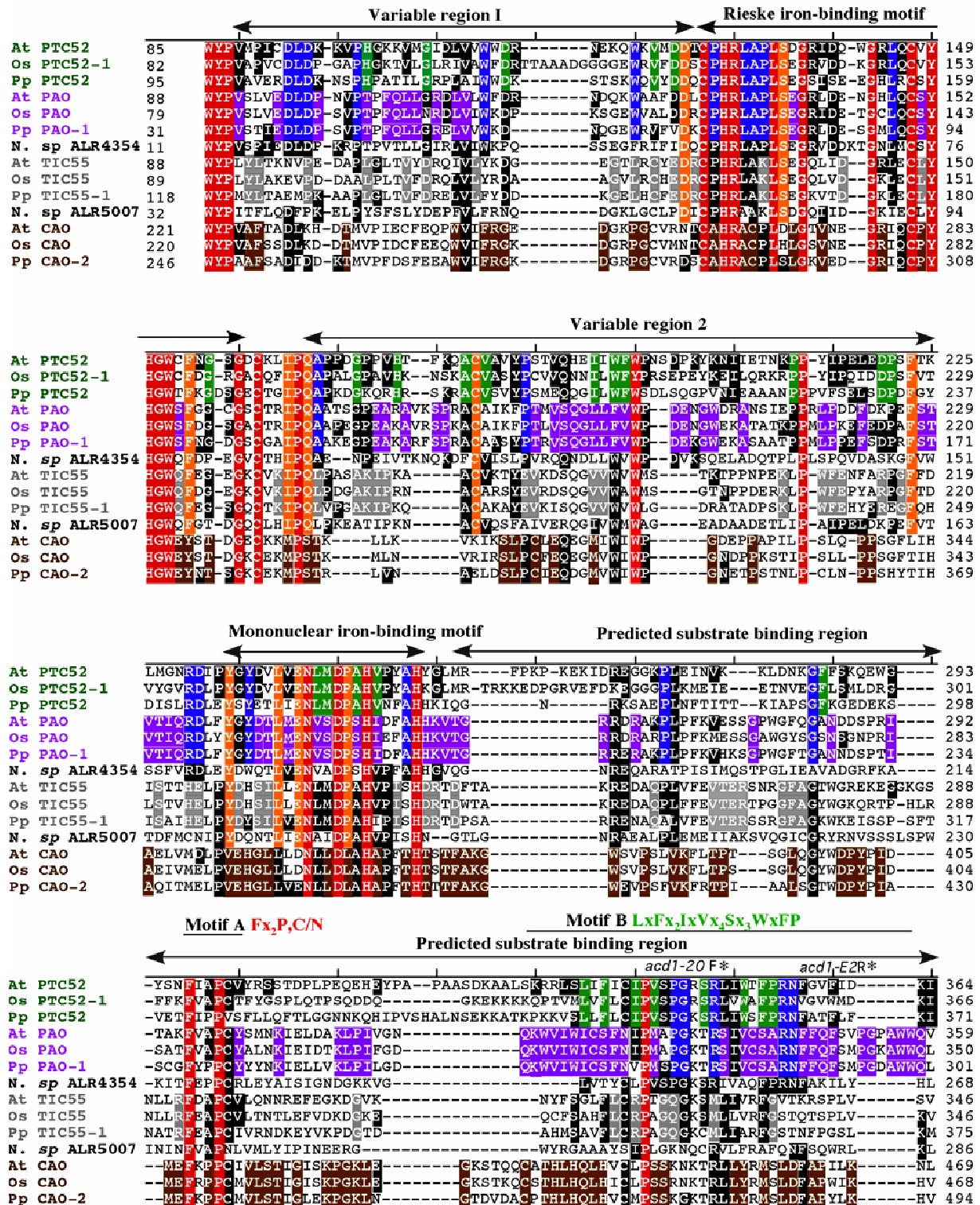
1. Reinbothe, S., Krauspe, R., Parthier, B. (1990) Partial purification and characterization of mRNAs for chloroplast and cytoplasmic aminoacyl-tRNA synthetases from *Euglena gracilis*. *J. Plant Physiol.* **137**, 81-87.



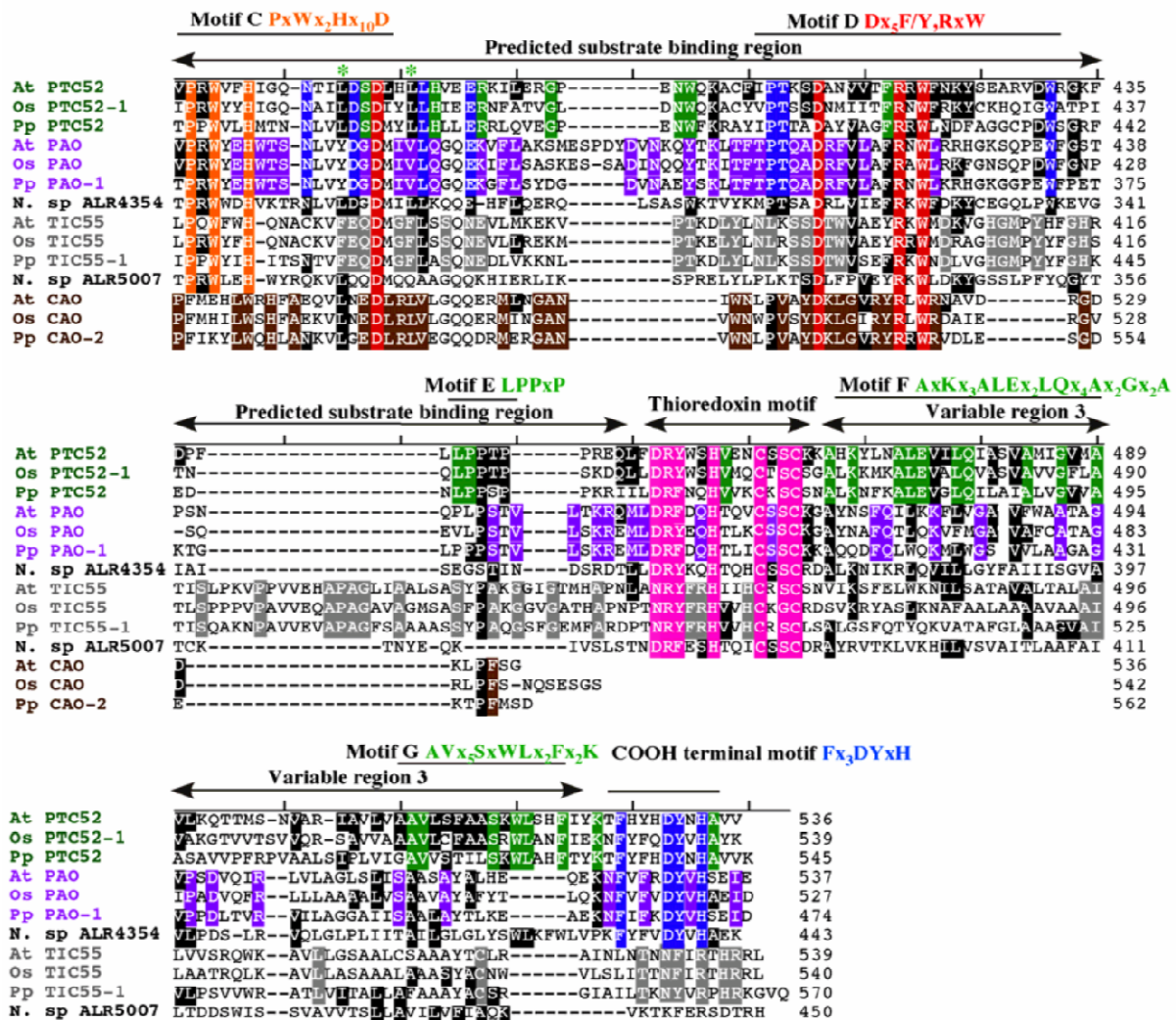
Supp. Fig. 14. Size exclusion chromatography to determine the size of PTC52-containing complexes.

AtPTC52-(His)₆-containing complexes were established with 2.5 nmoles of AtpPTC52-(His)₆ as described in Supp. Fig. 13, lane 2) and purified by Ni-NTA chromatography from solubilized OM-IM junction complexes. Then, the proteins and complexes bound to AtPTC52-(His)₆ were subjected to size exclusion chromatography on a Superose 6 column (Schemenewitz et al., 2007). PTC52-containing complexes were detected by SDS-PAGE and Western blotting using (His)₆- (solid line) or PTC52-specific antisera (dotted line). Migration of molecular mass standards is indicated.

Supplemental Figure 15 (continued on next page).



Supplemental Figure 15 continued.



Sup. Fig. 15. Amino acid residues conserved amongst different PTC52 related proteins from land plants.

Multiple sequence alignments of PTC52, PAO, TIC55 and CAO proteins from land plants (*Arabidopsis thaliana* At, *Populus trichocarpa* Pt, *Oryza sativa* Os, *Zea mays* Zm, and *Physcomitrella patens* Pp). Sequences from two related dioxygenases of unknown function from *Nostoc* species PCC 7120 are also included. Sequences are aligned from the first residue conserved in all proteins and 14 sequences are shown from an original alignment of 25 proteins including 5 land plants and three photosynthetic bacteria. Residues and motifs conserved amongst all proteins are shown in red, amongst the PTC52, PAO, and TIC55 subclades in orange, and amongst the PTC52 and PAO subclades in blue. Residues and motifs conserved uniquely within the PTC52 clade are shown in green, the PAO clade in purple, the TIC55 clade in grey and the CAO clade in brown. Conserved residues in the thioredoxin motif, which is only present in the PTC52, PAO and TIC55 families, are highlighted in pink. The two leucine residues uniquely conserved between PTC52 and CAO are shown with a green asterisk. Motifs of known and unknown functions are delineated by horizontal lines.

Supplementary Table 1: Conserved residues in predicted substrate binding domains of PTC52 related plant proteins ¹

	PTC52* PAO* TIC55* CAO	PTC52 alone	PAO alone		PTC52* PAO* TIC55* CAO	PTC52 alone	PAO alone		PTC52* PAO* TIC55* CAO	PTC52 alone	PAO alone
E/D,N,x2Hx4H	E241					F337	S326		<u>L385</u>		
	N242						F327			H386	Q381
			V247		C/N 339		N328		<u>E389</u>		
			S248			I340				R390	K385
	D245*				P341						F387
	P246*					V342	M331				L388
		A247	S251		<u>P344</u>				G396		
	H248				<u>G345</u>						D398
		V249	I253			S347					N400
	<u>A252</u>				<u>R348</u>					N399	
	H253						S338			W400	Y403
			H258			W351	V340				K405
			K259				C341				T407
			V260				S342				F408
			T261			P354	A344				T409
FxA/P,P,C/V			G262		<u>R355</u>				<u>P407</u>		
			R266		<u>N356</u>				<u>T408</u>		
	<u>P273</u>						F347				Q412
			S277				Q348				A413
			G278				F349		D411		
			W280				P352				R415
	G285*						G353				F416
		F286					A355				L418
			N286				W356			F417	
			I292				W357		R418		
	F297						Q358		W420		
	A/P 299				P366*						L424
	P300				W368*				<u>W431</u>		
	C/V 301						E365			L440	
			Y301		H371*					P441	
			K305				W367		P442		
			K311				T368		<u>T/S 443</u>		
			L312				S369				V448
			P313		<u>N375</u>						L449
			I314				Y373				K451
			Q318		<u>D379</u>						R452
			K319			S380	G375				M454
			W320		D381						L455
		L335	I324				I378				
			C325				V379				

4

**Three thioredoxin targets in the inner envelope
membrane of chloroplasts function in protein import
and chlorophyll metabolism**

Sandra Bartsch, Julie Monnet, Kristina Selbach, Françoise Quigley, John Gray,
Diter von Wettstein, Steffen Reinbothe, and Christiane Reinbothe

Proceedings of the National Academy of Sciences USA (2008) Vol. 105,
pp. 4933-4938

5 Summary

Higher plants contain a large superfamily of non-heme oxygenases sharing the same conserved Rieske and mononuclear iron binding domains. Members of this family comprise the inner plastid envelope translocon protein Tic55, pheophorbide *a* oxygenase (PAO), chlorophyllide *a* oxygenase (CAO), choline monooxygenase (CMO), and a 52 kDa protein (PTC52) associated with the precursor NADPH:protochlorophyllide (Pchl*a*) oxidoreductase A (pPORA) translocon. Previous experiments have shown that the expression of the *At*CAO cDNA in the cyanobacterium *Synechocystis*, which does not contain a CAO gene in its genome, gave rise not only to Chlorophyll *b* (Chl *b*), but also to low levels of Pchl*b*. Pulse labeling experiments using the isolated PTC complex and the Pchl*a* precursor 5-amino-levulinic acid (5-ALA) have shown that PTC52 operates as Pchl*a* oxygenase in the production of Pchl*b*.

PTC52 and CAO were further investigated with regard to their catalytic properties, plastid sublocalisation and physiological significance.

The coupled *in vitro* transcription/translation of *Arabidopsis* CAO (*At*CAO) and PTC52 (*At*PTC52) cDNAs in a wheat germ lysate led to the production of catalytically active proteins. The CAO protein converted Chl*a* to Chl*b*, but displayed only little activity with Pchl*a*. In contrast, PTC52 catalyzed Pchl*a* to Pchl*b* conversion *in vitro* (**Reinbothe et al., 2006; Bartsch et al., submitted for publication**).

In barley and *Arabidopsis* cotyledons, the import of pPORA requires Pchl*a*. During membrane passage, pPORA interacts with the components of the PTC complex and establishes junction complexes between the outer and inner plastid-envelope membranes. An association of CAO with such pPORA containing complexes would be indicative of redundant roles of CAO and PTC52. *In vitro* protein import and fractionation experiments were conducted to detect the plastid sublocalization of CAO and PTC52 and to analyze their role in the regulated import of different precursor proteins (**Reinbothe et al., 2006; Bartsch et al., submitted for publication**). CAO, which is synthesized as a larger precursor, is imported into the intermembrane space via the general protein import machinery comprising Toc159, Toc75, and Toc34. After import and processing, we showed CAO to be an intrinsic protein of the inner envelope and thylakoid membranes of barley and *Arabidopsis* chloroplasts, tethered to the lipid bilayers by either one α -helix or β -sheet. CAO imported into the plastid inner envelope also interacted with Tic40, Tic22, and Tic20 and established a novel Tic subcomplex (**Reinbothe et al., 2006**). To test the involvement of CAO in the

import of Chl *b*-containing LHC proteins, *in vitro* import experiments were done with the *Chlorina* mutant *chl-3* that lacks functional *CAO* gene and fails to accumulate Chl *b* and LHC proteins. With isolated *chl-3* chloroplasts the import of pLhcb1 (the precursor to the LHCII apoprotein) and pLhcb4 (the precursor to the CP29 apoprotein) was virtually undetectable, a result which was also confirmed by time course analyses (**Reinbothe et al., 2006**).

For PTC52 a similar, though distinct, function in the Pchl*a*-dependent plastid import pathway of pPORA was proposed. Import and plastid fractionation studies showed that PTC52 is synthesized as a larger, ≈ 57 kDa precursor which is imported into isolated barley and *Arabidopsis* chloroplasts and processed to mature size. We showed the mature 52 kDa protein to be an intrinsic membrane protein of the inner plastid envelope interacting with PTC130, PTC90, PTC16/Oep16 and PTC33/Toc33, forming a functional protein import complex (PTC complex). During the substrate-dependent import pathway of pPORA, PTC52 catalyzes the oxygenation of Pchl*a* (**Bartsch et al., submitted for publication**).

DEPC operates by ethoxyformylating the conserved His residues of the Rieske iron-sulfur cluster. The effect of different DEPC-concentrations on the import capability of plastids was analyzed with different precursor proteins. At low DEPC concentrations (1, 5, 50 μ M) only the import of pPORA was inhibited, whereas in the presence of 1 mM DEPC no pPORA import occurred, and translocation of Tic55 import substrates was reduced by approximately 10 %. This result proved the involvement of His residues in the catalytic mechanism of PTC52 as Pchl*a* oxygenase and part of the PTC complex (**Bartsch et al., submitted for publication**).

To demonstrate the physiological significance of PTC52 two *PTC52*-knockout-lines (SALK_011945 and SAIL_148.HC5) were used. We demonstrated that loss-of-function mutations in the *Arabidopsis PTC52* gene gave rise to an embryo-lethal phenotype. Because of this lethality heterozygous *AtPTC52/Atptc52* plants (SALK_011945) were utilized to gain insights into the role of PTC52 *in planta*. Heterozygous *AtPTC52/Atptc52* seedlings were more sensitive to illumination than wild-type plants, an observation that could be explained by lower amounts of light-harvesting POR-Pchl*a* (LHPP) complexes in the prolamellar bodies of etioplasts from *AtPTC52/Atptc52* versus wild-type plants. Pigment analyses by HPLC identified both Pchl*a* and Pchl*b* in wild-type seedlings and unveiled a change in their relative proportions towards Pchl*a* in *AtPTC52/Atptc52* seedlings. These changes correlated with decreases in normal Chl accumulation, an altered Chl *b*-to-Chl *a* ratio and a reduction of LHCII levels during the early hours of greening. In etiolated *AtPTC52/Atptc52*

seedlings which had been exposed to white light, both POR proteins were below the limit of detection, while only PORA was reduced in amount in wild-type plants. *In vitro*-import experiments displayed a ≈ 90 % reduction in uptake of ^{35}S -pPORA but not of ^{35}S -pPORB and a 40-50 % inhibition of ^{35}S -pLhcb1 import in *AtPTC52/Atptc52* versus wild-type chloroplasts (**Bartsch et al., submitted for publication**). *In vivo* *AtPTC52/Atptc52* seedlings show the same effects during greening, which may be understood when recalling that pLhcb1 import requires Chlide *b* (**Reinbothe et al., 2006**).

Thioredoxins (Trxs) are small redox-active proteins, catalyzing two successive one-electron transfer reactions. The catalytic mechanism requires the formation of a transient heterodisulfide bond between the reduced Trx and the oxidized protein (often containing redox-sensitive C(x)_nC pairs) before complete reduction of the target disulfide. Affinity purification procedures take advantage of the fact that mutation in one of the redox-active cysteines in the Trx active site stabilizes the normally transient heterodisulfide, thereby covalently linking the target protein to Trx via a bond that can be cleaved by DTT.

Using this approach we identified Tic55, PTC52 and PAO as novel Trx targets in the inner plastid envelope membrane of chloroplasts (**Bartsch et al., 2008**). Aside from the presence of conserved Rieske- and [2Fe-2S]-clusters these proteins share a CxxC motif at ≈ 73 aa from their COOH-terminal end. To test whether the activity of PTC52 and PAO of barley may be sensitive to regulation by Trx, activity measurements were performed in the presence or absence of stromal Trx *f* and Trx *m*. The experimental data suggested that both proteins may undergo reversible oxidation/reduction reactions involving redox-active protein SH-groups that in turn affect their activities, the reduced form being more active than the oxidized form. When mutant forms of Tic55, PTC52 or PAO, containing an Ala residue in place of the first or second Cys residue in the CxxC motif, were incubated with stromal extract of barley chloroplasts, both Trxs could be found. These results showed that Tic55, PTC52, and PAO had no preference with regard to either Trx *f* or Trx *m*. We assumed that Trx could regulate the activity of the three Rieske-type Fe-S-proteins in response to light-dark regulation and/or oxidative stress. To test this hypothesis we compared the *in vitro* import capability of the Tic/Toc complex, the CAO associated Tic complex (**Reinbothe et al., 2006**) and the PTC complex (**Bartsch et al., submitted for publication**) in *tigrina d12* chloroplasts isolated from light grown plants and from plants that had been shifted to a dark period or a nonpermissive dark to light shift before plastid isolation. We found that Tic55, PTC52, and PAO were sensitive to oxidative control and were inactivated in re-illuminated *tigrina d12* plants. No

CxxC motif is present in CAO, which does not respond to either the thioredoxin system or oxidative stress.

6 Zusammenfassung

Höher entwickelte Pflanzen enthalten eine große Superfamilie von non-Häm Oxygenasen, deren Mitglieder über identische, konservierte Rieske- und mononukleare Bindungsdomänen verfügen. Diese Familie umfasst das Translocon-Protein der inneren Plastidenhülle Tic55, Pheophorbid *a* Oxygenase (PAO), Chlorophyllid *a* Oxygenase (CAO), Cholin Monooxygenase (CMO) und ein 52 kDa schweres Protein (PTC52), welches in Assoziation mit dem Präkursor NADPH:Protochlorophyllid (Pchlid) Oxidoreduktase A (pPORA) Translocon vorliegt. Frühere Experimente zeigten, dass die Expression von *AtCAO* cDNA im Cyanobakterium *Synechocystis*, welches in seinem Genom kein *CAO*-Gen enthält, nicht nur zur Bildung von Chlorophyll *b* (Chl *b*), sondern auch von geringen Mengen an Pchlid *b* führte. *Pulse labeling* Experimente mit dem isolierten PTC-Komplex und dem Pchlid Präkursor 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) zeigten, dass PTC52 bei der Bildung von Pchlid *b* als Pchlid *a* Oxygenase agiert.

In dieser Arbeit sollten katalytische Eigenschaften, plastidäre Sublokalisierung und physiologische Bedeutung von PTC52 und CAO näher untersucht werden.

Die gekoppelte *in vitro* Transkription/Translation von *Arabidopsis* CAO (*AtCAO*) und PTC52 (*AtPTC52*) cDNAs im Translationssystem aus Weizenkeimen führte zur Bildung von katalytisch aktiven Proteinen. Das CAO-Protein wandelte Chlid *a* in Chlid *b* um, zeigte jedoch gegenüber Pchlid *a* nur eine geringe Aktivität. Im Gegensatz dazu katalysierte PTC52 *in vitro* die Umwandlung von Pchlid *a* zu Pchlid *b* (**Reinbothe et al., 2006; Bartsch et al., eingereicht zur Publikation**).

In Kotyledonen von Gerste und *Arabidopsis* ist der Import von pPORA von Pchlid abhängig. Während der Membran-Passage interagiert pPORA mit Komponenten des PTC-Komplexes und bildet dabei sog. „*junction*“-Komplexe zwischen äußerer und innerer Plastidenhülle. Eine Anlagerung von CAO an solche pPORA enthaltenden Komplexen könnte auf überlappende Funktionen von CAO und PTC52 hindeuten. Mit Hilfe von *In-Vitro*-Protein-Import- und Fraktionierungsexperimenten sollte die plastidäre Sublokalisierung von CAO und PTC52 detektiert und deren Bedeutung beim regulierten Import verschiedener Vorstufenproteine analysiert werden (**Reinbothe et al., 2006; Bartsch et al., eingereicht zur Publikation**). CAO, das als größeres Präkursor-Protein synthetisiert wird, wird durch die Standard-Protein-Import-Maschinerie, bestehend aus Toc159, Toc75 und Toc34, in den Intermembran-Raum importiert. Im Anschluss an den Import und die Prozessierung identifizierten wir CAO als intrinsisches Protein der inneren Hülle und der Thylakoid-Membranen von Gerste- und *Arabidopsis*-Chloroplasten, gebunden an die Lipid-Doppelschicht entweder durch eine

α -Helix oder ein β -Faltblatt. Nach dem Import in die innere Plastidenhülle interagierte CAO mit Tic40, Tic22 und Tic20 und bildete einen neuen Tic-Subkomplex (**Reinbothe et al., 2006**). Um die Beteiligung von CAO am Import von Chl *b*-enthaltenden LHC-Proteinen zu analysieren, wurden *In-vitro*-Import-Experimente mit der *Chlorina* Mutanten *chl-3* durchgeführt, die kein funktionelles CAO-Gen besitzt und weder Chl *b* noch LHC-Proteine akkumuliert. Mit isolierten *chl-3*-Chloroplasten war kein Import von pLhcb1 (= Präkursor des LHCII-Apoproteins) bzw. pLhcb4 (= Präkursor des CP29-Apoproteins) erkennbar, was auch im Rahmen von „*time course*“-Analysen bestätigt werden konnte (**Reinbothe et al., 2006**).

Für PTC52 wurde eine ähnliche, jedoch unterschiedliche Funktion beim Pchlid-abhängigen plastidären Import von pPORA vorgeschlagen. Wie Import- und plastidäre Fraktionierungsanalysen zeigten, wird PTC52 als größeres, ca. 57 kDa schweres Vorstufenprotein synthetisiert, in isolierte Gerste- bzw. *Arabidopsis*-Chloroplasten importiert und zur endgültigen Größe prozessiert. Wir identifizierten das reife, 52 kDa schwere Protein als intrinsisches Membranprotein der inneren Plastidenhülle, wo es mit PTC130, PTC90, PTC16/Oep16 und PTC33/Toc33 interagierte und einen funktionellen Protein-Import-Komplex (PTC-Komplex) bildete. Während des substratabhängigen Imports von pPORA katalysiert PTC52 die Oxygenierung von Pchlid *a* (**Bartsch et al., eingereicht zur Publikation**).

DEPC agiert, indem es konservierte His-Reste im Rieske-Fe-S-Cluster ethoxyformyliert. Der Einfluss verschiedener DEPC-Konzentrationen auf die Import-Kapazität von Plastiden wurde mit unterschiedlichen Präkursor-Proteinen analysiert. Während bei geringen DEPC-Konzentrationen (1, 5, 50 μ M) allein der Import von pPORA inhibiert war, war in Anwesenheit von 1 mM DEPC kein pPORA-Import nachweisbar, wohingegen hier die Translokation von Tic55-Import-Substraten nur um ca. 10 % verringert war. Dieses Ergebnis bestätigte die Beteiligung der His-Reste am katalytischen Mechanismus von PTC52 als Pchlid *a* Oxygenase und Teil des PTC-Komplexes (**Bartsch et al., eingereicht zur Publikation**).

Um die physiologische Bedeutung von PTC52 zu untersuchen, wurden zwei *PTC52*-knockout-Linien (SALK_011945 und SAIL_148.HC5) verwendet. Wir zeigten, dass *loss-of-function*-Mutationen im *Arabidopsis PTC52*-Gen zu einem embryoletalen Phänotyp führten. Auf Grund dieser Letalität wurden heterozygote *AtPTC52/Atptc52*-Pflanzen (SALK_011945) verwendet, um die Bedeutung von PTC52 *in planta* zu analysieren. Heterozygote *AtPTC52/Atptc52*-Keimlinge waren empfindlicher gegenüber einer Belichtung als Wildtyp-

Pflanzen, was durch die geringeren Mengen an „*light-harvesting*“ POR-Pchlid (LHPP) – Komplexen im Prolamellarkörper von Etioplasten aus *AtPTC52/Atptc52*- versus Wildtyp-Pflanzen erklärbar war. Durch Pigmentanalysen mittels HPLC konnte sowohl Pchlid *a* als auch Pchlid *b* in Wildtyp-Keimlingen identifiziert werden, wobei deren relative Anteile in *AtPTC52/Atptc52*-Pflanzen in Richtung Pchlid *a* verschoben waren. Diese Veränderungen gingen mit einem Rückgang der normalen Chl-Akkumulation, einem veränderten Chl *b*/Chl *a*-Verhältnis und einer Verringerung der LHCII-Mengen während des frühen Ergrünens einher. In etiolierten *AtPTC52/Atptc52*-Keimlingen, die Weiß-Licht ausgesetzt waren, lagen die Mengen beider POR-Proteine unter der Detektionsgrenze, während in Wildtyp-Pflanzen allein die Menge an PORA reduziert war. *In-Vitro*-Import-Experimente zeigten einen ca. 90%igen Rückgang der Aufnahme von ³⁵S-pPORA, jedoch nicht von ³⁵S-pPORB, und eine ca. 40-50%ige Inhibierung des ³⁵S-pLhcb1-Imports in *AtPTC52/Atptc52*- versus Wildtyp-Chloroplasten (**Bartsch et al., eingereicht zur Publikation**). *In vivo* zeigten *AtPTC52/Atptc52*-Keimlinge während des Ergrünens dieselben Effekte, was durch die Abhängigkeit des pLhcb1-Imports von Chlid *b* erklärt werden konnte (**Reinbothe et al., 2006**).

Thioredoxine (Trxs) sind kleine, redox-aktive Proteine, die zwei aufeinander folgende Ein-Elektron-Transfer-Reaktionen katalysieren. Ihr katalytischer Mechanismus erfordert die Bildung einer transienten Heterodisulfid-Bindung zwischen reduziertem Trx und oxidiertem Protein (welches oft redox-sensitive C(x)_nC-Paare enthält) bevor das Target-Disulfid komplett reduziert wird. Die Affinitätschromatographie nutzt die Tatsache, dass eine Mutation in einem der redox-aktiven Cysteine der Trx-aktiven Seite die normalerweise transiente Heterodisulfid-Bindung stabilisiert, wodurch das Target-Protein kovalent an Trx gebunden wird und durch DTT wieder davon abspaltbar ist.

Mittels dieser Technik identifizierten wird Tic55, PTC52 und PAO als neue Trx-Targets in der inneren Plastidenhülle (**Bartsch et al., 2008**). Abgesehen von der Anwesenheit konservierter Rieske- und [2Fe-2S]-Cluster weisen diese Proteine ein CxxC-Motiv auf, das ca. 73 AS von deren COOH-Terminus entfernt ist. Um zu analysieren, ob die Aktivität von PTC52 und PAO aus Gerste sensitiv gegenüber einer Regulation durch Trx ist, wurden Aktivitätsmessungen in An- bzw. Abwesenheit von stromalem Trx *f* und Trx *m* durchgeführt. Die experimentellen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass beide Proteine reversiblen Oxidations/Reduktionsvorgängen, vermittelt durch redox-aktive SH-Gruppen, unterliegen, die deren Aktivitäten beeinflussen, wobei die reduzierte Form eine höhere Aktivität aufweist

als die oxidierte Form. Bei der Inkubation mutanter Formen von Tic55, PTC52 bzw. PAO, die einen Ala-Rest anstelle des ersten bzw. zweiten Cys-Restes im CxxC-Motiv enthielten, mit Stroma-Extrakt aus Gerste-Chloroplasten konnten beide Trx-Formen detektiert werden. Diese Ergebnisse zeigten, dass Tic55, PTC52 und PAO keine Vorliebe für Trx *f* bzw. Trx *m* aufwiesen. Wir stellten die Hypothese auf, dass Trx die Aktivität der drei Rieske-Typ Fe-S-Proteine als Reaktion auf die Licht-Dunkel-Regulation und/oder oxidativen Stress regulieren könnte. Um dies zu verifizieren, verglichen wir die *In-Vitro*-Import-Kapazitäten des Tic/Toc-Komplexes, des mit CAO-assoziierten Tic-Komplexes (**Reinbothe et al., 2006**) und des PTC-Komplexes (**Bartsch et al., eingereicht zur Publikation**) in *tigrina dl2* – Chloroplasten, die aus Pflanzen stammten, die entweder unter kontinuierlichem Weiß-Licht angezogen oder vor der Plastiden-Isolierung verdunkelt bzw. einem Dunkel-Licht-*Shift* unterworfen worden waren. Wir konnten zeigen, dass Tic55, PTC52 und PAO sensitiv gegenüber einer oxidativen Kontrolle reagierten und in wiederbelichteten *tigrina dl2* – Pflanzen inaktiv waren. In CAO ist kein CxxC-Motiv vorhanden, so dass CAO weder auf das Thioredoxin-System noch auf oxidativen Stress reagiert.

7 Eigenanteil der Arbeiten in den Artikeln/Manuskripten

A role for chlorophyllide *a* oxygenase in the regulated import and stabilization of light-harvesting chlorophyll *a/b* proteins.

Reinbothe, C., Bartsch, S., Eggink, L.L., Hooper, J.K., Brusslan, J., Andrade-Paz, R., Monnet, J., Reinbothe, S. (2006)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **103** (2006), 4777-4782

- *In-Vitro*-Expression von CAO
- Charakterisierung von Protein-Import-Komplexen (Reinigung dieser Komplexe und Analyse von deren Zusammensetzung bzw. ihre Charakterisierung durch *Western-Blot*-Analysen)

A protochlorophyllide (Pchl_{id}) *a* oxygenase involved in plastid import of NADPH:Pchl_{id} oxidoreductase (POR) A is essential for plant viability.

Bartsch, S., Saksou, J., Yang, M., Gray, J., Rossig, C., Bolling, L., Reinbothe, C., and Reinbothe, S.

Einreichung steht bevor in *Plant Physiology*.

- Isolation von verschiedenen *Knockout*-Mutanten des *PTC52*-Gens, Charakterisierung dieser Mutanten auf genetischer Ebene (Bestimmung der T-DNA-Insertionsstelle im Genom [Genotyping, Sequenzierung der PCR-Produkte], *Southern-Blot*-Analyse)
- Charakterisierung ausgewählter *ptc52-knockout*-Mutanten auf molekularer und biochemischer Ebene:
Northern- und *Western*-Blot-Analysen, Bestimmung der Pigmentgehalte und damit Untersuchungen zur Fähigkeit, unter verschiedenen Lichtbedingungen zu ergrünen
- Klonierung des *PTC52*-Gens in verschiedene Expressionsvektoren
- Protein-Expression im Translationssystem aus Weizenkeimen und in Bakterien sowie Reinigung (Anreicherung) der gebildeten Proteine als Grundlage zur
- Bestimmung der katalytischen Aktivität

Three thioredoxin targets in the inner envelope membrane of chloroplasts function in protein import and chlorophyll metabolism.

Bartsch, S., Monnet, J., Selbach, K., Quigley, F., Gray, J., von Wettstein, D., Reinbothe, S., Reinbothe, C.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **105** (2008), 4933-4938

- Klonierung der Gene für PTC52 und PAO in geeignete Expressionsvektoren
- Isolation von Pigmenten zur Untersuchung der Aktivität von PTC52/PAO
- *In-Vitro*-Expression von Proteinen (PTC52 und PAO) und Bestimmung ihrer enzymatischen Aktivität
- Untersuchungen zum Proteinimport (Gelelektrophoretische Analyse von Importstudien)
- RNA-Isolation und *Northern-Blot*-Analysen zum Vergleich der Transkriptmengen bzw. Expressionsmuster von *PTC52* und *PAO* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen
- Proteinextraktion und *Western-Blot*-Analysen zur Bestimmung der Unterschiede in der Proteinakkumulation von PTC52 und PAO unter verschiedenen Wachstumsbedingungen

8 Anhang

***In vitro*-mutagenesis of
NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase B:
two distinctive protochlorophyllide binding
sites participate in enzyme catalysis and
assembly**

Christiane Reinbothe, Frank Buhr, Sandra Bartsch, Claire Desvignes,
Françoise Quigley, Hélène Pesey, Steffen Reinbothe

***Molecular Genetics and Genomics* (2006), Vol. 275,
pp. 540-552**

Eigenanteil

Reinbothe, C., Buhr, F., Bartsch, S., Desvignes, C., Quigley, F., Pesey, H., Reinbothe, S. (2006) *In vitro*-mutagenesis of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase B: Two distinctive protochlorophyllide binding sites participate in enzyme catalysis and assembly. *Mol. Gen. Genomics* **275**, 540-552

- Extraktion von Proteinen aus isolierten Organellen von Wildtyp- und PORB-defizienten-Pflanzen
- Analyse von Marker-Proteinen in diesen Extrakten zur Charakterisierung der PORB *Knockout*-Mutante
- Pigmentisolation im Rahmen der Bestimmung der katalytischen Aktivität von PORB-Mutanten-Proteinen, die durch *In-Vitro*-Mutagenese hergestellt wurden

Herzlichen Dank!

Frau **PD Dr. C. Reinbothe** für die Überlassung dieses anspruchsvollen Themas, ihr Verständnis in schwierigen Phasen und die konstruktive Kritik.

Herrn **Prof. Dr. Dr. h.c. E. Beck** für viele Denkanstöße seitens der Seminare und das Interesse an der wissenschaftlichen Arbeit.

Herrn **Prof. Dr. S. Clemens** für die Gastfreundschaft, die mir am Lehrstuhl zuteil wurde.

Frank Buhr und **Armin Springer** für die akustische Untermalung der Arbeitsatmosphäre und die vielen kleinen, lieb gewordenen Sticheleien und Späße, die den Alltag im „Labor 06“ so angenehm gestalteten.

Allen „alten“ Angehörigen des Lehrstuhls Pflanzenphysiologie für deren Unterstützung.

Allen neuen Lehrstuhlmitgliedern für deren freundliche Aufnahme und Hilfsbereitschaft, die mir die letzte Etappe der Arbeit erst ermöglicht haben.

Christiane Meinen und **Angelika Fischbach** für die Hilfe bei den Kleinigkeiten des Laboralltags und die wertvolle Unterstützung.

Den Gärtnern der Universität Bayreuth für die Betreuung der Pflanzen.

Mathias (Zahnarzt), der dafür sorgte, dass ich mir nicht an meinem Computer die Zähne ausgebissen habe.

Meinen Eltern, auf deren Unterstützung ich mich immer 100%ig verlassen kann.

Meiner Schwester, die stets ein offenes Ohr für mich hat und mit mir gemeinsam versucht, scheinbar Unmögliches möglich zu machen.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, dass ich anderweitig mit oder ohne Erfolg nicht versucht habe, diese Dissertation einzureichen. Ich habe keine gleichartige Doktorprüfung an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden.

Bayreuth, den 29. Juli 2009

Sandra Bartsch